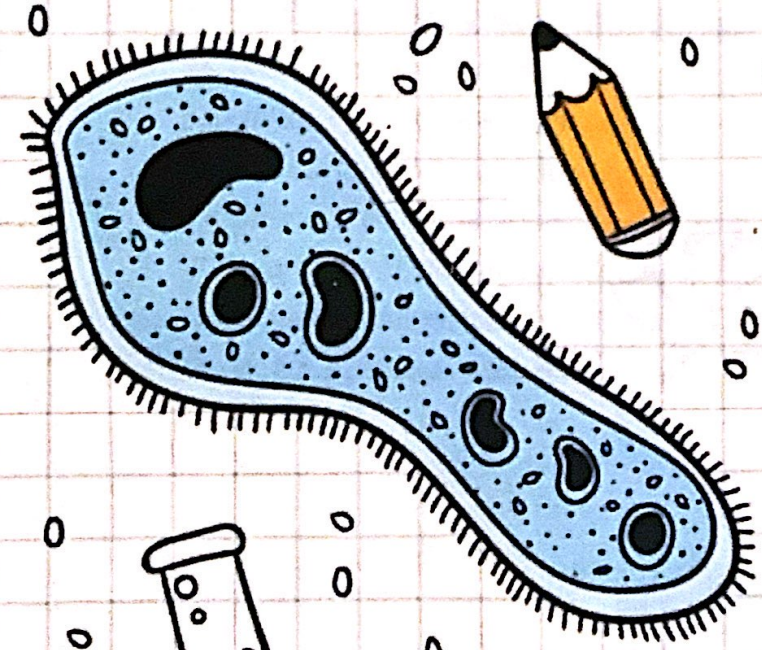
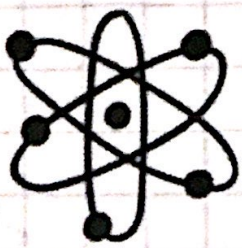
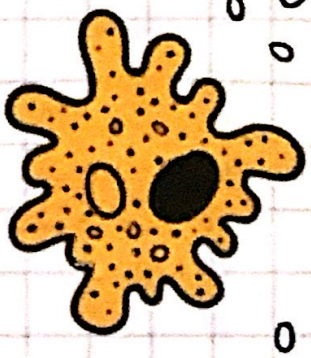
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

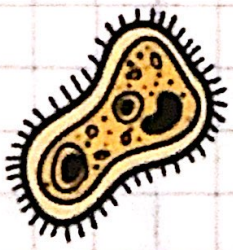
Curso práctico de

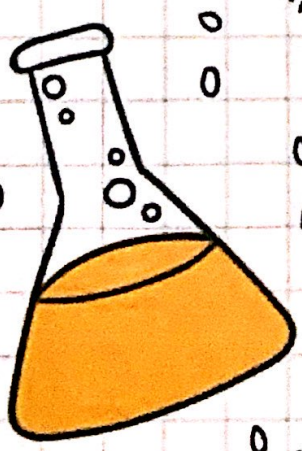
BIOLOGÍA MOLECULAR

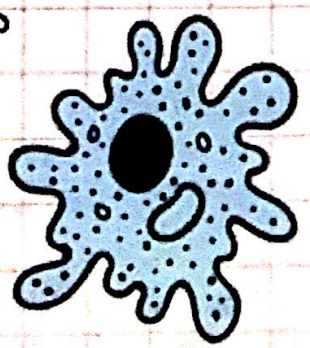


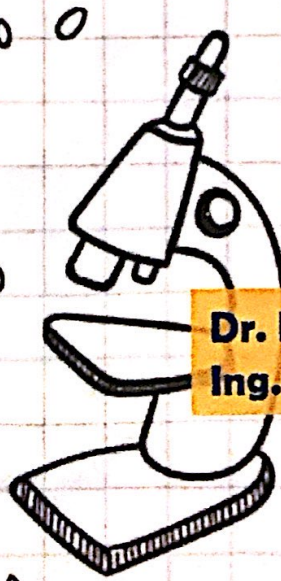




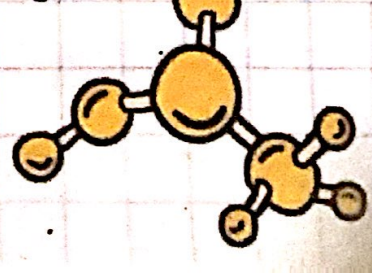








Dr. Herbert Aguilar Bravo
Ing. Stephani Rodríguez Villagras

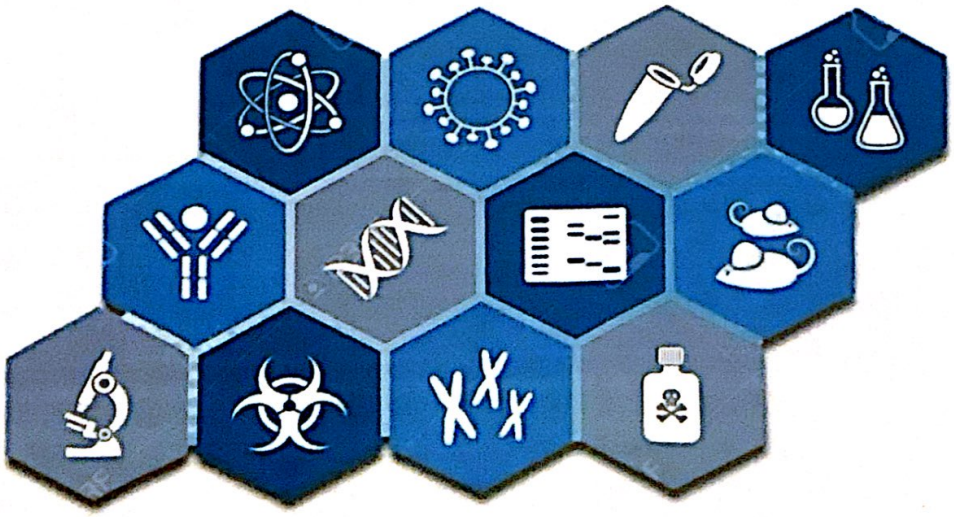


2024

Scanned with CamScanner

INDICE

EL LABORATORIO, USO Y MANEJO DE EQUIPOS Y MICROPIPETAS....3
PREPARACION DE SOLUCIONES Y DILUCIONES....15
LA CELULA: UNIDAD DE VIDA....24
CROMOSOMAS, BANDEO CROMOSOMICO Y CARIOTIPOS....36
EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DE ADN....46
ANALISIS ELECTROFORETICO DEL ADN....56
EXTRACCION Y PURIFICACION DE RNA....63
ANALISIS ELECTROFORÉTICO DEL RNA....72
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS....79
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)....86
LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA....94
TALLER: PCR aplicaciones dentro de la veterinaria....101



Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°1

EL LABORATORIO, USO Y MANEJO DE EQUIPOS Y MICROPIPETAS

I. OBJETIVO

- ✓ Reconocer los equipos e instrumental que se utilizan en biología molecular
- ✓ Determinar las condiciones de exactitud y reproducibilidad de las micropipetas.

II. INTRODUCCION

En esta práctica conoceremos de manera general un laboratorio implementado para investigación y aprendizaje de biología molecular, este espacio tiene como objetivo estudios en donde el principal material serán los ácidos nucleicos y su manipulación dentro de la molécula de ADN o ARN. El equipo que se requiere entonces será específico y genérico.

Es muy importante que los materiales y equipos de uso común en el laboratorio se identifiquen por su nombre correcto y uso específico que tiene cada uno, pero más importante es saber manejarlo correctamente en el momento oportuno, teniendo en cuenta los cuidados y normas especiales para el uso de aquellos que así lo requieran.

III. MARCO TEORICO

3.1 EQUIPOS ESPECIALIZADOS PARA UN LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

- ❖ **Cámara de electroforesis:** Ideales para preparaciones rutinarias de técnicas de electroforesis, para la separación de proteínas y ácidos nucleídos, técnicas de secuenciación de ADN, patrones de bandas y análisis de oligonucleótidos.
- ❖ **Termociclador:** que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger
- ❖ **Balanza Analítica:** Puede determinar el peso en miligramos con una capacidad máxima de 110 hasta 1010 gramos (según el modelo).
- ❖ **Centrífuga:** Es un equipo de laboratorio que genera movimientos de rotación, tiene el objetivo de separar los componentes que constituyen una sustancia. Hoy en día hay existe una diversidad de centrifugas que tiene diferentes objetivos, independientemente del tipo de investigación o industria.
- ❖ **Freezer:** Es uno de los equipos más importantes. Su función consiste en mantener, en un ambiente controlado (espacio refrigerado), diversos fluidos y sustancias para que los mismos se conserven en buenas condiciones (mientras más baja sea la temperatura, menor actividad química y biológica).
- ❖ **Autoclave:** Es un dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a ebullir a pesar de su alta temperatura. El fundamento de la autoclave es que coagula las proteínas de los microorganismos debido a la presión y temperatura, aunque recientemente se ha llegado a saber de algunas formas acelulares, tal como los priones, que pueden soportar las temperaturas de autoclave.

Scanned with CamScanner

3.2 USO CORRECTO DE LAS MICROPIPETAS.

Las micropipetas son dispositivos que permiten medir volúmenes pequeños que van desde 1 µl hasta 1 ml o más. Al igual que las pipetas estas pueden ser para contener o para verter volúmenes. Durante el curso utilizaremos micropipetas para verter, ya sea un volumen variable. En las de volumen variable, se puede seleccionar un volumen dentro de un rango de valores determinado. La micropipeta más comúnmente usada en los laboratorios de análisis fue introducida por la compañía Eppendorf y este nombre se adoptó de forma genérica para estos dispositivos, aunque hoy en día existen una gran cantidad de compañías y modelos similares que funcionan bajo un mismo principio de pistones para operar. Por lo tanto, es aconsejable consultar las instrucciones del fabricante sobre el empleo correcto de cada modelo. Sin embargo, todas ellas utilizan puntas o "tips" descartables plásticos que se ajustan al extremo de la micropipeta. En estas puntas de plástico es donde se deposita un líquido a medir.

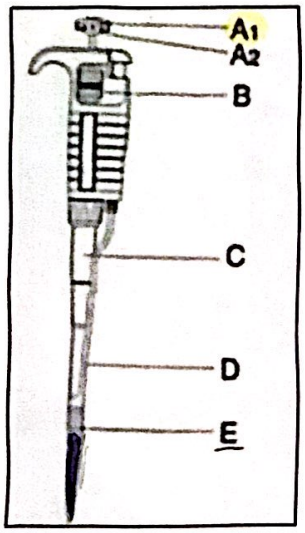


Figura 1. Esquema general de las micropipetas marca BioRad a utilizar durante el curso. A1: botón pulsador, A2: tornillo del botón pulsador, B: rueda dentada de graduación del volumen, C: cono de la pipeta, D: expulsor de punta y E: punta o "tip" descartable.

Tomado del manual de manejo de micropipetas Biorad, BR/06/05

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

- ✓ Agua

4.2 MATERIALES

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Beakers
- ✓ Micropipetas P10, P20, P200 y P1000
- ✓ Puntas Azules y Amarillas

V. PROCEDIMIENTO PARA EL MANEJO DE MOCROPIPETAS

Para absorber el líquido, el pistón es presionado hasta una primera posición, el tip es puesto en contacto con el líquido y luego, lentamente, se permite que el pistón vuelva a su posición original. Este pase permite el llenado del tip con el volumen correspondiente. El tip de plástico generalmente no se seca por fuera ya que se considera que su superficie no absorbe líquido. A continuación, se describen las instrucciones específicas para los micropipetas que se utilizaran durante el curso (Figura 1).

Scanned with CamScanner

1. Selección de la micropipeta a utilizar el volumen a dispensar. Para este paso, se aplican las mismas reglas que se utilizan para el manejo de las pipetas. El Cuadro 1 muestra los rangos de volúmenes que se pueden pipetear con cada modelo de micropipeta de la marca Biorad, además de los usos más comunes. La mayoría de las micropipetas indica en el botón pulsador el rango o volumen máximo que pueden pipetear. Para prevenir un daño en el mecanismo interno de la micropipeta recuerde nunca sobrepasar los volúmenes máximos permitidos para cada micropipeta.

Cuadro 1. Modelo, rango de volúmenes y aplicaciones más comunes de las micropipetas marca Biorad a utilizar durante el curso.

Modelo	Rango de volumen (µl)	Uso más común
BR10	0.5-10	Medida y transferencia de microvolumenes. Biología molecular y ensayos enzimáticos.
BR20	2-20	Medida y transferencia de soluciones acuosas en general, ácidos y bases.
BR200	20-200	Igual a BR20
BR1000	100-1000	Igual a BR20

1000 - 25
= Vn = 250

2. Debido a que la micropipeta tiene un rango de volumen ajustable, es necesario seleccionar el volumen a medir. Para ello se debe localizar el indicador de volumen, compuesto de tres dígitos que se deben leer de arriba hacia abajo. En la parte más baja del indicador hay una escala que permite el ajuste del volumen al último digito o decimal permitido según el caso. En las micropipetas de 2 hasta 200 µl, los dígitos negros indican microlitos y los dígitos rojos representan decimas de microlito.
3. Ajustar el volumen de la pipeta con el tornillo del botón pulsador (Figura 1, A2) o la rueda de graduación del volumen (Figura 1, B), hasta llegar a 1/3 por encima del valor deseado. Luego, lentamente girando el tornillo o la rueda, disminuir el ajuste hasta el valor deseado prestando atención para no excederlo. Si se excede, es aconsejable repetir el procedimiento de ajuste. Siempre se debe ajustar el volumen deseado desde un volumen más alto disminuyendo las indicaciones del indicador.
4. Seleccionar la punta o tip plástico apropiado para la micropipeta: la punta debe ajustarse al cono de la micropipeta (Figura 1). Al insertar la punta en el cuerpo de la pipeta hay que aplicar una fuerte presión con movimiento giratorio para asegurar la hermeticidad. Nunca usar la pipeta con líquidos sin la punta colocada. Es posible que la punta plástica se encuentre en una caja también plástica que facilita su uso. Si la punta no queda bien ajustada o no esta en caja, deberá ajustarse con la mano sin tocar la superficie que estará en contacto con la solución a extraer.
5. Aspiración: apretar el botón pulsador hasta el primer tope (Figura 2A)
6. Con la pipeta en posición vertical, sumergir la punta entre 1 mm y 3 mm en la muestra.
7. Lentamente se aspita el líquido al relajar la presión del dedo sobre el botón pulsador (Figura 2B). Si este paso no se realiza con atención, puede entrar aire en la punta y la cantidad de muestra aspirada no es la adecuada.

Scanned with CamScanner

8. Esperar un segundo y retirar la punta del líquido.
9. Dosificación: colocar la parte inferior de la punta contra la pared interior del recipiente donde se depositará el líquido, con un ángulo entre 10° y 40°
10. Apretar el botón pulsador suavemente hasta el primer tope (Figura 2C) y esperar un segundo.
11. Apretar el botón pulsador hasta el segundo tope para vaciar el resto del líquido (Figura 2D).
12. Mantenimiento apretado el botón pulsador en el segundo tope, retirar la pipeta deslizando la punta por la pared del recipiente. Soltar luego el botón pulsador (Figura 2E).
13. Expulsar la punta apretando el botón del expulsor (Figura 2F y Figura 2D).

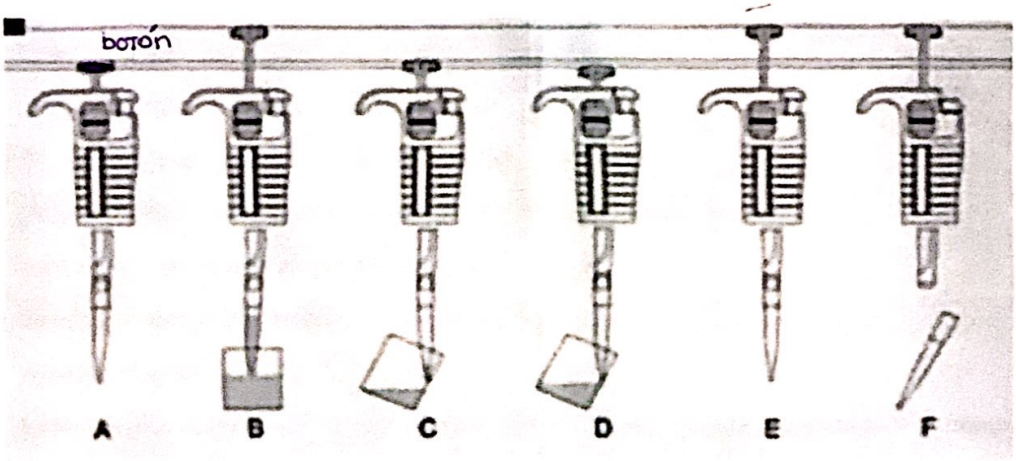


Figura 2. Posiciones de la micropipeta a la hora de medir un volumen especifico. A: Botón pulsador en el primer tope, B: la punta de la micropipeta es sumergida entre 1 mm y 3 mm en la muestra para luego liberar el botón pulsador suavemente hasta su posición original, C: Forma correcta de dispensar el líquido medido en el recipiente correspondiente, D: Posición de la micropipeta al apretar el botón pulsador hasta el segundo tope, E: Vuelta a la posición inicial, F: Expulsión de la punta, la cual debe ser descartada en un recipiente apropiado.

VI. CONTROL GAVIMETRICO DE LAS MICROPIPETAS

Este principio servirá para verificar el nivel de precisión y exactitud de una micropipeta

6.1 CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS

La micropipeta puede perder su calibración. Comprobación la calibración de la pipeta es un procedimiento simple que puede ahorrar tiempo considerable, energía y reactivos. En esta práctica se aprenderá a usar la micropipeta de tamaños diversos, medir su *exactitud, precisión y calibración*.

NOTA: No trate de colocar la micropipeta para volúmenes mayores que el máximo, o para volúmenes menores del cero, esto descalibrará y dañara la micropipeta.

6.2 PROCEDIMIENTO

a. Determinar la temperatura del agua de ensayo (apuntar).
b. Ajustar el volumen nominal de la pipeta al mayor volumen.

Scanned with CamScanner

Tipo de pipeta	Volumen nominal al 100%	Volumen nominal al 50%	Volumen nominal al 25%
P1000	1000 µl	500 µl	250 µl
P200	200 µl	100 µl	50 µl
P20	20 µl	10 µl	5 µl
P50	50 µl	25 µl	12.5 µl

c. Colocar un beaker limpio sobre la balanza y tararla a cero.

d. Colocar un tip nuevo sobre la punta de la pipeta a calibrar.

e. Oprimir el pulsador hasta su PRIMER tope.

f. Sumergir la punta del tip en el envase de agua destilada.

g. Dejar retroceder el pulsador lentamente y de manera uniforme.

h. Evitar secar el exterior de la punta del tip

i. Expulsar el agua en el interior de beaker a pesa.

j. Apuntar el valor obtenido del display

k. Volver a tarar la balanza y repetir los pasos hasta obtener lecturas para cada valor nominal

6.3 ANÁLISIS DE DATOS

Para cada micropipeta revisar el porcentaje de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%). Para esto se usaran las siguientes ecuaciones:

- **Valor medio o promedio (X):**

$$\bar{X} = \frac{(\sum x_i)}{n}$$

Donde x_i son los valores pesados en la práctica y n es el número de veces que se peso

- **Volumen medio (V):**

$$V = \frac{\bar{X}}{\rho}$$

Donde X es el valor medio y ρ es la densidad del líquido a pesar, en este caso es agua por lo que usaremos el valor de 1.0032 g/ml

- **Exactitud (E%):**

$$E(\%) = \frac{(V - V_{nominal})}{V_{nominal}} \times 100$$

Donde V es el volumen medio y V nominal es el valor teórico

Scanned with CamScanner

- **Desviación estándar (σ):**

$$\sigma = \left[\sqrt{\frac{\Sigma((x_i - \bar{X})^2)}{n-1}}\right] \times \frac{1}{\rho}$$

Al final de la ecuación se multiplica por la inversa de la densidad porque así hallaremos el valor de la desviación en unidades de volumen. En esta ecuación se usan datos de las anterlores ecuaciones.

- **Coeficiente de variación en % (C_V):**

$$C_V\% = \frac{\sigma}{V} \times 100$$

6.4 LÍMITES DE TOLERANCIA PARA MICROPIPETAS

Volumen (µl)	E% teórico	CV% teórico
5 – 10	1	0.8
20 – 50	0.7	0.4
100 – 1000	0.5	0.2

VII. RESULTADOS

7.1 Calibración de las micropipetas

Recopilar los datos de peso para la calibración de micropipetas por grupos como se indica en las siguientes tablas, posteriormente se compararán los resultados de la clase entre grupos. Adjuntar los cálculos que se realizaron.

N° de pesada	Volumen nominal al 100% (1 ml)	Volumen nominal al 50% (0,5 ml)	Volumen nominal al 25% (0,25 ml)
1	0,011	0,0055	0,00275
2	0,006	0,003	0,0015
3	0,010	0,005	0,0025
4	0,009	0,0045	0,00225
5	0,008	0,004	0,002
6	0,007	0,0035	0,00175
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—
n=10	$X_{(promedio)}$ = 0,0085 µl	$X_{(promedio)}$ = 0,00425 µl	$X_{(promedio)}$ = 0,01275 µl
ρ = 1.0032	$V_{(medio)}$ = 0,0084 µl	$V_{(medio)}$ = 0,004 µl	$V_{(medio)}$ = 0,0127 µl

Solo trabajamos con volumenes

$\frac{VH}{P}$

Scanned with CamScanner

Valoración del control gravimétrico:

Valor	Volumen nominal al 100% (1 ml)	Volumen nominal al 50% (0,5 ml)	Volumen nominal al 25% (0,25 ml)
E%	-99,916	-99,957	-99,475
C_V%	0,0084	0,0039	0,0021

Escriba las operaciones que realizo para sacar el promedio y el volumen medio de una de las columnas:

Promedio : $X = \frac{(\text{Suma de los valores pesados})}{\#\text{ veces que se pesó}}$: Columna 1 : 100 % (1ml)

$X = \frac{0,051}{6} = 0,0085$

Vol. medio : $V = \frac{X}{\text{densidad } H_2O} = \frac{0,0085}{1,0032} = 0,0084$ ml.

Escriba la operación que realizo para sacar la exactitud de una de las columnas: 1era columna

$E = \frac{\text{Vol. medio} - \text{Vol. nominal}}{\text{V. nominal}} \times 100$

$E = \frac{0,0084 - 0,011}{0,011} \times 100 = 23,63$ µl

Escriba las operaciones que realizo para conseguir la desviación estándar y el coeficiente de variación de una de las columnas:

Columna 1.

Desviación estándar :

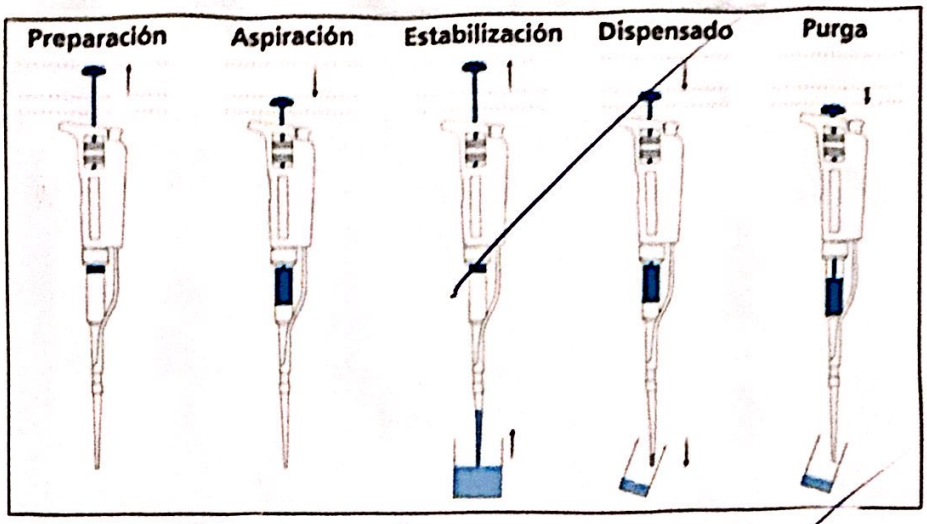
$\alpha = \sqrt{\frac{((0,051 - 0,008)^2)}{6 - 1}} \times \frac{1}{1,0032} = 0,019$ µl

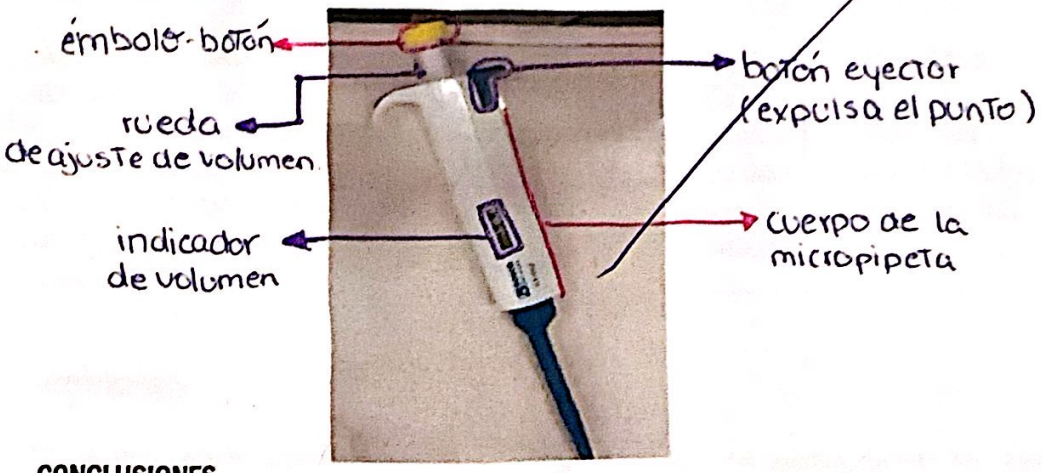
Coeficiente de variación :

$Cv\% = \frac{\alpha}{V\text{medio}} \times 100 = \frac{0,019}{0,008} \times 100 = 237,5$ µl.

Scanned with CamScanner

Explique de manera gráfica como se debe utilizar una micropipeta señalando las partes más importantes de estas y las recomendaciones que más utilizarías en un laboratorio de biología molecular:





VIII. CONCLUSIONES

Tener precauciones al momento de realizar la práctica o manipular los instrumentos ya que cualquier error afectaría en los resultados finales.

Tener conocimiento de la micropipeta y usar la adecuada para las indicaciones que nos piden (volumen), es bueno también colocar un volumen adecuado (ni mayor ni menor) porque puede causar la descalibración de la micropipeta.

Saber que las puntas de estas micropipetas son para un solo uso y por ende se desechan luego de la práctica.

Scanned with CamScanner

IX. DISCUSIÓN

El uso de la micropipeta nos ayuda a medir volúmenes de líquido con mayor precisión ; por lo cual es muy importante en un laboratorio , existen puntas amarillas y azules. Tenemos 3 tipos de micropipetas P10, P20, P100 en uso.

Reconocer el tipo de micropipeta y sus pipetas para ajustar su volumen deseado, también el tipo de punta correcta ; presionar el botón, con un líquido listo en un beaker o cualquier , meter la punta al líquido que tenemos y aspirar (solo una vez) para luego echar el líquido en el instrumento que usaremos, y al final la punta será desechada ya que no es reutilizable

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Doctor Genoma . Cómo utilizar las micropipetas [Internet] . Blog de Laboratorio. 2009 [citado el 19 de marzo del 2024]. Disponible en : https://blogdelaboratorio.com/como-utilizar-las-micropipetas/
2. Consideraciones en el uso y mantenimiento de micropipetas [Internet]. Universitat Politécnica de Valencia. 2020 [citado el 19 de marzo de 2024]. Disponible en : https://m.riunet.upv.es/.

XI. ACTIVIDADES

1) **Se presentarán algunos equipos, complete la imagen del equipo (puede ser pegada o dibujada) y escriba el uso que tiene dentro del laboratorio de biología molecular:**

Tubos eppendorf:

· Es como un contenedor cilíndrico de material plástico, evita el desprendimiento de las sustancias (líquidos)

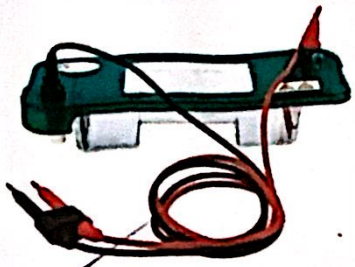
Vortex:

"Agitador", sirve para agitar muestras que se encuentran en tubos de ensayo pequeños.

Scanned with CamScanner

Cámara de electroforesis:

Es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde están las muestras.



Fuente de poder:

Este aparato administra corriente constante y directa al sistema de electroforesis; nos indica y permite controlar el voltaje.

Microcentrifuga:

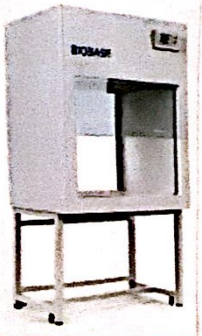
Dispositivo que se usa para manejar volúmenes pequeños. Tiene como objetivo separar los componentes en dos fases.

Termociclador:

Máquina de PCR, permite realizar de forma automatizada y secuencial los ciclos de temperaturas necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR de ADN.

Hot plate:

Llamadas placas calefactoras, se usan para calentar el material de su contenido (soluciones).



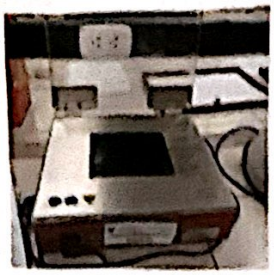
Cámara de flujo laminar:

Instrumento que se usa para tener un ambiente libre de contaminación, es decir que garantiza que el flujo de aire sea limpio

Scanned with CamScanner

Shaker:

"Mezclador", sirve para preparar soluciones y la mezcla de líquidos de cualquier tipo.



Transiluminador:

Dispositivo que produce luz (blanca, UV o azul), sirve para visualizar geles de electroforesis.

Espectrofotómetro visible UV: vis

Instrumento que mide la absorbancia, intensidad de la luz que pasa la solución o muestra, mediante la ley de Beer-Lambert.

2) Si usted desea verter el volumen X en un tubo eppendorf seleccione la(s) micropipeta(s) que puede usar (asumiendo que todas están sin errores de reproducibilidad y de exactitud)

X µl	P – 2	P – 10	P – 20	P – 100	P – 200	P – 1000
12 µl			X			
22 µl				X	X	
44 µl				X	X	

3) Si tuviera una P-20 con E% = + 10% que haría usted para verter 12 µl.

Primero necesitamos calibrar la micropipeta que tiene un error porcentual de ±10%, ajustamos la micropipeta a 12µl y realizamos varias mediciones de peso de agua destilada en una balanza.

O también configurarla a un volumen ligeramente inferior a 12µl y realizar más mediciones para saber que marca 12µl.

4) Si no tuviera una P-100, como dispensaría 22 µl

En este caso si no tuviéramos una P-100, usaríamos una P-20, luego procedemos a ajustar el volumen de 20 µl y pipeteamos; finalmente ajustamos a 2 µl y añadimos el volumen restante, aspiramos y dispensamos el líquido

Scanned with CamScanner

5) Mencione material y equipos de protección para el investigador que se utiliza en el laboratorio de biología molecular.

En el laboratorio se realizan diversas actividades en las cuales se manipula una gran variedad de productos químicos y reactivos, por lo cual, es importante contar con equipos de protección personal.

Los más frecuentes son:

- Protección para los ojos: gafas de seguridad
- Protección para las manos: guantes
- Protección para las vías respiratorias: mascarilla normal, KN95...
- Protección para el cuerpo: mandil, mameluco, cubre botas

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°2

PREPARACION DE SOLUCIONES Y DILUCIONES

I. OBJETIVO

- ✓ Preparar soluciones porcentuales, molares, simples y seriadas
- ✓ Preparar soluciones stock, también llamados madres, para próximas prácticas

II. MARCO TEORICO

2.1 PREPARACION DE SOLUCIONES

Una solución es una mezcla homogénea de una o más sustancias que no reaccionan entre sí; está compuesta por sustancias llamadas solutos y otras llamadas solventes, disolvente o diluyente, esta última por lo general está en mayor proporción.

Una solución tiene como mayor característica la proporción que hay entre el soluto y el solvente, llamada concentración las cuales se expresan básicamente de 2 formas, de forma porcentual en términos de peso por litro y como molaridad en unidades SI (mol/l).

oPORCENTAJES:

Las concentraciones expresadas de forma porcentual se refieren a partes de soluto por 100 partes de solución (de ahí el termino por-centaje = "por cien"). Estas pueden dividirse en:

- Peso por unidad de peso (peso en peso) p/p: Tanto el soluto como el solvente son mezclados según su peso en gramos y la proporción del soluto se expresa por 100 g de solución. Ejemplo: una solución de NaCl al 24% (p/p) contiene 24 g de NaCl (soluto) por cada 100 g de la solución.

$$24\ g\ de\ NaCl + 76\ g\ de\ agua = 100\ g\ de\ solucion$$

$$\frac{24\ g\ NaCl}{100\ g\ Solucion} = \frac{240\ g\ NaCl}{1000\ g\ Solucion} = 24\%$$

- Volumen por unidad de volumen v/v: El soluto y el solvente son medidos por su volumen en ml y su proporción es igual a la anterior, ml de soluto por 100 ml de solución. Ejemplo: una solución de HCl al 1% (v/v) contiene 1 ml de HCl puro por 100 ml de solución.

- Peso por unidad de volumen p/v: En este caso el soluto es medido en gramos y será disuelto en un solvente medido por su volumen en ml. Serán gramos de soluto por 100 ml de solvente. Ejemplo: una solución de $MgCl_2$ al 7% contiene 7 gramos de $MgCl_2$ por cada 100 ml de solución.

Nota: Si el porcentaje no especifica la forma de expresión, es decir, p/p, v/v o p/v, se asume que el porcentaje esta expresado en peso por unidad de volumen.

Scanned with CamScanner

Problema 1: Calcular cuántos gramos de NaOH se pesó para obtener 300 ml de una solución al 10%.

Primero se coloca la cantidad de solución deseada y se multiplica por la proporción que pide. Sabemos que una solución al 10% contiene 10 g de NaOH por 100 ml de solución.

$$300\ ml\ de\ solucion \times 10\%$$

$$300\ ml\ de\ solucion \times \frac{10\ g\ de\ NaOH}{100\ ml\ de\ solucion} = 30\ g\ de\ NaOH$$

MOLARIDAD (M)

Con respecto al termino molaridad, este expresa concentración de una sustancia en particular, en términos de numero de moles por litro de solución y se expresa por el símbolo M o mol/l.

Problema 2: Calcule cuantos gramos de NaOH se deben pesar para preparar 2.5 l de una solución de NaOH 0.1 M

Paso 1	En el caso de la molaridad es importante tener el peso molecular del NaOH, el cual es la suma de todos los pesos moleculares de los iones que la componen en este caso el total es de 40 g/mol.
Paso 2	Posteriormente es necesario saber la proporción que nos piden en este caso es el 0.1 M el cual quiere decir 0.1 mol/l (0.1 moléculas por litro de solución).
Paso 3	Ahora se plantea la ecuación en el siguiente orden: primero la cantidad final de solución que se pide, multiplicada por la proporción pedida, por el peso molecular del soluto.

$$2.5\ l\ de\ solucion\ NaOH \times \frac{0.1\ molecula}{1\ l\ de\ solucion\ de\ NaOH} \times \frac{40\ g\ de\ NaOH}{1\ molecula} = 10\ g\ de\ NaOH$$

Así que en este caso se debe pesar 10 g de NaOH y diluirlo hasta llegar a 2.5 l de agua para obtener una solución al 0.1 M

2.2 CALCULO Y EXPRESIÓN DE DILUCIONES

Una disolución consiste en preparar una solución menos concentrada a partir de una más concentrada. Esta práctica es muy común en los laboratorios y de ella depende en gran parte el resultado analítico que se obtenga. Las diluciones generalmente se expresan como una razón matemática, por ejemplo 1:5 (o 1/5), 1:10 (o 1/10), etc. En el caso de una dilución 1:5, se puede entender como que se usara 1 volumen de la solución stock (o madre) en un volumen final de 5 volúmenes. Para poder realizar este cálculo se puede usar la siguiente ecuación:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Dónde:

- ✓ V1 es el volumen de la solución stock que se debe añadir para preparar la solución diluida
- ✓ C1 es la concentración de la solución stock
- ✓ V2 es el volumen de la solución diluida
- ✓ C2 es la concentración de la solución diluida

Scanned with CamScanner

Nota: Es importante verificar que las unidades de los volúmenes V1 y V2 sean iguales entre ellas de la misma forma que de las concentraciones C1 y C2

Problema 3: Prepare 500 ml de una solución glucosa 5 mol/l a partir de una solución de glucosa stock a 45 mol/l.

Paso 1 Identificamos los datos que nos dan y que nos piden, entonces sabemos que queremos un volumen de 500 ml (V1) a una concentración de 5 mol/l (C1)

Paso 2 Además, sabemos que la solución stock tiene una concentración de 45 mol/l (C2) pero no sabemos cuánto volumen debemos extraer de ahí.

Paso 3 Aplicamos la ecuación

$$500\ ml\ (V1) \times 5\ mol/l\ (C1) = V2 \times 45\ mol/l\ (C2)$$

$$V1 = 55.56\ ml\ de\ la\ solucion\ stock$$

Entonces, para preparar 500 ml de la solución que deseamos de 5 mol/l debemos sacar 55.56 ml de la solución stock de 45 mol/l y llevar a 500 ml con agua.

2.3 FACTOR DE DILUCION

El factor de dilución representa el número de veces que fue diluida la solución concentrada, normalmente es expresada en fracción de 1 sobre el número de dilución (1/x), por lo que si multiplicamos el factor de dilución por la concentración stock entonces la respuesta seria la concentración final de la solución. Por ejemplo, si deseamos sacar el factor de dilución entonces dividimos la concentración stock con la final:

$$45\ mol/l \div 5\ mol/l = 9$$

$$Factor\ de\ Dilucion = \frac{1}{9}\ o\ {}^{1}/_{9}$$

$$45\ mol/l \times \frac{1}{9} = 5\ mol/l$$

Si se hace más de una disolución seguida se denomina disolución seriada, en estos casos se deben multiplicar todos los factores de dilución. Por ejemplo, si la solución de glucosa de 45 mol/l es primero diluida 1/9 y a esta segunda se diluye en 1/100 entonces la concentración final seria

$$45\ mol/l \times \frac{1}{9} \times \frac{1}{100} = 0.05\ mol/l$$

Y su factor de dilución es de 900 o 1/900

III. REACTIVOS Y MATERIALES

3.1 REACTIVOS

- ✓ Tns base
- ✓ Cloruro de amonio
- ✓ Bicarbonato de sodio
- ✓ SDS (dodecilsulfato sódico)

Scanned with CamScanner

- ✓ NaCl
- ✓ Etanol
- ✓ Isopropanol
- ✓ EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- ✓ Ácido acético y ácido clorhídrico

3.2 MATERIALES

- ✓ Balanza analítica
- ✓ pHMETRO
- ✓ Probetas
- ✓ Beakers
- ✓ Fiolas
- ✓ Micropipetas P10, P20, P200 y P1000
- ✓ Puntas Azules y Amarillas

IV. PROCEDIMIENTO

Preparar las siguientes soluciones: Tris-HCL pH 7.6 (1M), NaCl (5M), SDS 20%, Isopropanol a 40%, Etanol a 70%, Buffer TE 10X, NH4Cl 1M. Buffer Lisis de eritrocitos (NH4CL 0,15, KHCO3 Y EDTA 0,1 mM) Buffer Lisis de Leucocitos (NaCl 100 mM, Tris – HCl 10 mM, Ph 8,0) Buffer TE (Tris – HCl 10 mM, EDTA 1 mM)

V. RESULTADOS

5.1 Preparación de soluciones

Se prepararán las soluciones que se usaran en la siguiente práctica, sin embargo, en el anexo se verán además las concentraciones de varias soluciones stock las cuales se irán utilizando conforme las practicas avancen.

Para esta parte de la práctica se pedirá presentar los cálculos utilizados para hallar las concentraciones de cada componente. Finalmente se mezclará cada sustancia y se guardaran en frascos limpios, es importante recordar medir el pH y etiquetarlos con el nombre de la sustancia, del grupo y la fecha de preparación.

Scanned with CamScanner

Al calcular las soluciones se obtuvo:

300ml de solución x10 %

$$300ml \times \frac{10g\ de\ NaOH}{100ml\ de\ sol} = 80g\ de\ NaOH$$

300 − 30 = 270 de diluyente

Luego

Calcula cuanto gr debió pesarse.

$$2,5L\ de\ sol\ NAOH \times \frac{0.1mol}{1L\ de\ sol\ NaOH} \times \frac{40g\ de\ NAOH}{1mol} = 10g\ (NaOH)$$

(sol = solv; mol = molar = mol)

1. Se obtuvo 10g
2. diluirlo en 2,5 L para obtener una sol de 0,1M y concentración
3. se realizo el calculo tris-HCl, NACl, isopropanol...

   tenemos la sol. madre : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
4. Finalmente usamos fórmula.
5. Solución : $500ml(V_1) \times 5mol(C_1) = V_2 \times 45\ mol/L(C_2)$

$$2500 = V_2 \times 45$$

$$\frac{2500}{45} = V_2$$

$55,56$ → ml de la sol stock

aparte: 500 − 55.56 = 444.44 ml de agua destilada

VI. CONCLUSIONES

Es muy importante conocer sobre las disoluciones, por sus diversas reacciones y operaciones en el área de laboratorios.

La mezcla de los volúmenes y medidas exactos nos indica un buen manejo y trabajo en el área.

Como sabemos hay muchos formas de expresar la concentración a través de los fórmulas de Porcentaje, Molaridad, Diluciones y el Factor de dilución.

La solución se define como una mezcla homogénea de una o más sustancias que no reaccionan entre sí.

Scanned with CamScanner

VII. DISCUSIÓN

Las soluciones son mezclas homogéneas de dos o más especies moleculares o iónicas (sustancias), toda solución presenta dos componentes: el soluto (el que es disuelto en otro) y un solvente o disolvente (disuelve al soluto).
Un ejemplo sería el azúcar (soluto) y agua (solvente)
El soluto y solvente no pueden separarse por métodos físicos como filtración.
Solamente se pueden separar mediante la destilación, cristalización o cromatografía.
La disolución, el disolvente se encuentran en mayor cantidad/proporción que el soluto.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, D. O. Solución Química - Concepto, tipos y características. [Citado el 27 de marzo del 2024]. Disponible en: https://concepto.de/solucion-quimica/.

2. Tema características generales de las disoluciones. [Internet] [Citado el 27 de marzo del 2024]. Disponible en: https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/43171/mod_resource/content/1.pdf.

IX. ACTIVIDADES

1) **Calcule las siguientes concentraciones**
   - 10 M NaOH, diluido 1:20 = 0,5 M 10M/L x 1/20 = 0,5M
   - 2 M HCl, diluido 1:5 = 0,4 M 2M/L x 1/5 = 0,4M
   - 1000 mg/L glucosa diluido 1:10 y luego 1:2 = 50 mg/L 1000x 1/10 = 100 x 1/2 = 50 mg/L
   - 250 ml de 5% NaCl contienen 12,5 g de NaCl p/vol
   - ¿Cuánto $CuSO_4.5H_2O$ debe ser pesado para preparar 100 ml de $CuSO_4$ al 5%? = 7,82 g
   - ¿Qué porcentaje de $CuSO_4.5H_2O$ es agua? = 36 %

2) **¿Cuántos gramos de $MgCl_2$ hay en 1 g de $MgCl_2.3H_2O$?** (PM del $MgCl_2.3H_2O$ es 149 g/mol, PM del $MgCl_2$ es 95 g/mol) (PM=Peso molecular) 0,64g

3) **¿Cuántos mililitros de NaOH 0.4M se necesitaran para preparar 20 ml de una solución 0.2 M?** se necesitan 10 ml de NaOH para preparar la solución de 0.2M.

4) **¿Qué porcentaje de Mg contiene $MgCl_2.3H_2O$?** contiene 16,32% Mg.

5) **¿Cuánto $CuSO_4.5H_2O$ debe ser pesado para preparar 1 L de una solución que contenga 80 mg de CuSO4.5H2O?** se necesita 80mg de $CuSO_4.5H_2O$.

6) **El PM de $CaCO_3$ es de 100 g/mol, ¿Cuántos gramos son necesarios para preparar:**
   - 1L de 0.1 M CaCO3? 1 x (0,1/1) x (100/1) = 10 gr.
   - 50 mg/L de CaCO3? : 0,05 gr.

Scanned with CamScanner

7) **La solución salina normal tiene una concentración a 0.85%. ¿Cuál es su molaridad? (PM NaCl = 58.5g/mol)** La molaridad es 0,145 mol

8) **¿Cuántos gramos de Na_2HPO_4 deben ser pesados para preparar 1 L de una solución cuya concentración es de 50 mg/ml?** Deben pesarse 50 gr.

9) **¿Cuál es la concentración en mol/l de una solución que tiene 100 g de NaOH disueltos en 100 ml de agua? (PM NaOH = 40 g/mol)** la concentración es de 25 mol/l

2. $MgCl_2 \cdot 3H_2O$: 149 g/mol

$MgCl_2$ = 95 g/mol

• Aplicando regla de 3 simple

149 — 95

as — x

$x = \frac{95}{149} = 0,637 = 0,64$ gr (redondeado)

3. Aplicamos la fórmula de diluciones.

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

$V_1 = x$

$V_2 = 20$ ml

$C_1 = 0,4$ M

$C_2 = 0,2$ M

$x \times 0,4 = 20 \times 0,2$

$x = \frac{4}{0,4}$

$x = 10$ ml

4. $MgCl_2 \cdot 3H_2O$ PM: 149 g/mol

Mg = 24.31

$\% = \left(\frac{\text{M. del componente}}{\text{M. Total del compuesto}}\right) \times 100$

$Mg\% = \frac{24.31}{149} \times 100$

$Mg\% = 16,31 = 16,32\%$ redondeado

5. 80 mg = ~~0,080~~ gr(x)

$M = \frac{\text{Soluto}}{\text{Solución}}$ $\frac{80}{1L} = 80$ mg

6. Fórmula de Molaridad (M)

1. PM = 100 $CaCO_3$

L = 1 $CaCO_3$

M = 0,1 $CaCO_3$

$1 \times \frac{0,1 \text{ mol}}{1} \times \frac{100}{1 \text{ mol}} =$

$0.1 \times 100 = 10$ gr

2. PM = 100

v = 50 mg/L = 0,05 g/L

↳ solo convertir →

7. 0,85 %gr : $\frac{0.85}{100} = 0,0085$

$M = \frac{\#\text{soluto}}{\text{Vol. solución(L)}}$

1000 ml —— 0,85 %

1 L —— 8.5 gr

$\frac{8.5 \text{ gr}}{58.5} = 0,145$ mol

8. gr Na_2HPO_4 = ?

Vol = 1 L = ml

Conc. : 50 mg/ml = 0,050 g/ml

$0,050 \times 1000 = 50$ gr/ml

9. 1 mol NaOH : 40 g/mol

masa NaOH = 100 gr

Vol = 0,1 Litros (100 ml).

$\frac{100}{40} = 2.5$

$M = \frac{2.5}{0,1} = 25$ mol/L

Scanned with CamScanner

Apéndice: composición de Buffers y Soluciones Stock

SOLUCION STOCK	PREPARACION		
Cloroformo : alcohol isoamílico (50 ml)	La solución debe tener una concentración 24:1 Cloroformo 43 ml	Alcohol Isoamílico 2 ml	
Buffer Lisis de Eritrocitos pH 7.4 (50 ml)	• NH_4Cl • $NaHCO_3$ • EDTA	155mM 10 Mm 100mM	0,4 g 0,042 g 1,9 g
Buffer Lisis de Leucocitos pH 8.2 (50 ml)	• NaCl • EDTA (pH 8) • SDS • Tris pH 7.5-	5M 0.25M 10% 2M	16 g 4 g 0,05 g 4 g
Solución proteinasa K (10 ml)	• Proteinasa K • SDS • EDTA	10 mg/ml 1% 125 mM	1,2 g 1 g 0,001 g
Buffer TE pH 8.0 (50 ml)	• Tris – HCl pH 7.5 • EDTA	10 mM 1 mM	0,4 g 0,016 g
Buffer de carga (5 ml)	• Glicerol • Azul de bromofenol • Azul de xilencianol	30% 0.25% 0.15%	0,0006 g 0,036 g 0,15 g
Agarosa (30 ml)	Se usara agarosa al 1 % 80 g		
Buffer TBE 5X pH 8 (100 ml)	• Buffer TBE 10X • Tris • Ácido borico • EDTA	1L 108 g 55 g 9.3 g	
Solución de resuspención celular plasmídica (50 ml)	• Tris – HCl • EDTA pH 8	50 mM 10mM	0,40 g 0,03 g
Solución de lisis celular plasmídica (50 ml)	• NaOH • SDS	200 mM 1% w/v	0,4 g 0,01 g
Solución de neutralización celular plasmídica (50 ml)	Acetato potásico 3:1		
Tris – HCl 1M	Disolver 121.1 gramos de Tris base en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH al valor deseado añadiendo las siguientes cantidades de HCl concentrado: pH 7.4 – HCl (ml) 70 pH 7.6 – HCl (ml) 60 pH 8.0 – HCl (ml) 42 Llevar a un litro, distribuir en alícuotas y esterilizar en el autoclave		
EDTA 0.5M pH 8.0	Añadir 186.1 gramos de ácido etilen-diamino-tetra-acetico deshidratado (EDTA) a700 ml de agua destilada. Agitar vigorosamente con un agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N, aproximadamente 50 ml. Enrazar a un litro con agua destilada. Distribuir en alícuotas y autoclavar.		
SDS 20%	Disolver 20 gramos de SDS en 80 ml de agua destilada calentar a 68°C para disolver. Ajustar el pH a 7.2 añadiendo gotas de NaOH 10 N. enrazar a un volumen de 100 ml		

Scanned with CamScanner

NaCl 5M	Disolver 292.2 g de NaCl en 800 ml en agua destilada. Ajustar el volumen a un litro con agua destilada. Distribuir en alícuotas y esterilizar en el autoclave.
Acetato de sodio 3M	Disolver 408.1 g de acetato de sodio trihidratado en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada. Dispensar en alícuotas y esterilizar en el autoclave.
Acetato de potasio 5M	Disolver 49.1 g de acetato de potasio en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con ácido acético glacial 3M. llevar a 100 ml. Dispensar en alícuotas y esterilizar en el autoclave
Glucosa 0.5M	Disolver 90.1 g de glucosa en agua destilada y llevar a 100 ml. Dispensar en alícuotas y esterilizar en el autoclave.
Bromuro de etidio	Añadir 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua destilada. Disolver utilizando un agitador magnético, por varias horas hasta asegurar su total disolución. Envolver el recipiente en papel de aluminio, o transferir la solución a una botella oscura, y almacenar a temperatura ambiente.
TAE 10 X	Para 500 ml, pesar 24.2 g de tris base adicionar 5.71 ml de ácido acético glacial para ajustar el pH a 7.4, más 10 ml EDTA a 0.5 M, disolver lo hasta 500 ml con agua destilada. Dispensar en alícuotas y esterilizar en el autoclave.
Buffer de muestras 10X	Ficoll 400 al 20% (en su lugar se puede utilizar sucrosa); SDS 1%; xylene cyanol 0.25%; EDTA disódico pH 8.0 100 mM; azul de bromofenol 0.25%.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°3

LA CELULA: UNIDAD DE VIDA

I. OBJETIVO

- ✓ Observar algunos tipos de células tanto animales como vegetales.
- ✓ Observar estructuras celulares como pared celular, cloroplastos, núcleo, mitocondrias y ribosomas.
- ✓ Determinar algunas semejanzas y diferencias entre la célula procariota y la eucariota.
- ✓ Determinar la importancia de ciertos colorantes y soluciones en la identificación de estructuras y sustancias celulares.
- ✓ Verificar que las células tienen formas y tamaños variables.

II. INTRODUCCION

La célula es la unidad estructural y funcional básica de la vida, es además la unidad más pequeña de la materia que posee vida. Todos los procesos propios de un organismo vivo como; nutrición, metabolismo, reproducción, etc. se llevan a cabo dentro de la célula. Estos procesos son ejecutados por estructuras especializadas dentro de la célula.

Toda célula proviene de otra célula; por lo tanto, una célula animal se auto reproduce en otra célula animal y una célula vegetal en otra célula vegetal y entonces tenemos que es la autor reproducción una de las principales características de la vida. Esta característica es posible por el material genético que cada una carga y duplica en cada célula hija. En esta práctica reconoceremos cada parte de la célula y la localización del material genético dentro de esta.

III. MARCO TEORICO

Sabemos que todos los organismos están compuestos por células, pero las células pueden ser de distintos tipos. Además, los seres vivos pueden estar formados de una o más células. Según el número de ellas que presenten pueden ser de dos tipos:

- ❖ **Organismos unicelulares**: Son aquellos que están formados por una sola célula. La célula realiza todas las funciones vitales. Pueden ser procariotas o eucariotas. Ejemplo de este tipo de organismos son las bacterias, las algas cianofíceas, los protozoos y muchas algas eucariotas. A veces viven en grupos estables, denominados colonias. En este caso, unas células realizan un tipo de función y otras células otro. Sin embargo, cada célula puede vivir de forma independiente de la colonia, asumiendo todas las funciones vitales.
- ❖ **Organismos pluricelulares**: Son seres vivos, todos ellos eucariotas, formados por muchas células. Todas las células del organismo han surgido a partir de una única célula que ha formado a las demás. Por ello, todas las células presentan la misma información genética, aunque no la expresen de la misma manera. Las células no sobreviven aisladas, ya que pierden algunas capacidades, con el fin de especializarse en una función concreta. Así se forman los distintos tejidos que pueden formar un organismo pluricelular. Ejemplo de organismos pluricelulares son los animales, incluida la especie humana, las plantas, los hongos y muchas algas eucariotas.

Scanned with CamScanner

Las células también se clasifican atendiendo al grado de complejidad que presentan en su estructura. De este modo se distinguen:

3.1 CÉLULAS PROCARIOTA

Las células procariotas no contienen núcleo que proteja al material genético. Los organismos procariotas son las bacterias y las algas cianofíceas. Todos ellos pertenecen al Reino Moneras.

Generalmente presentan las siguientes partes:

a) **Pared rígida** que le da forma.

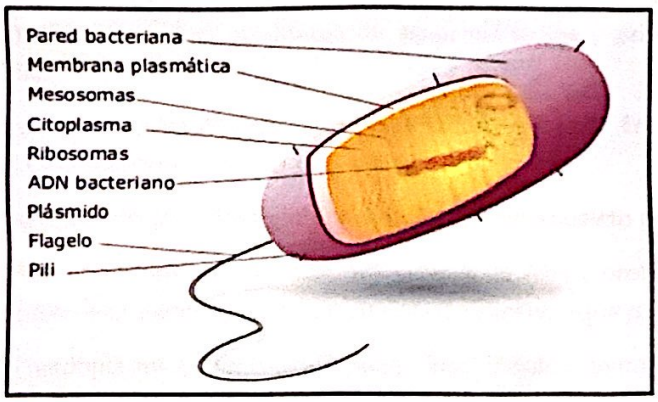
b) **Membrana plasmática** que les separa del medio donde viven y que controla el paso de sustancias. Presenta unas arrugas hacia su interior que se denominan mesosomas. En ellos se realiza gran cantidad de actividades celulares, como fijar el ADN, realizar la respiración celular, produciendo energía o controlar la división de la célula.

c) **Citoplasma**, que está lleno de agua y contiene gran cantidad de sustancias disueltas, gotas de lípidos o inclusiones de sustancias de reserva como el almidón. En el citoplasma se realizará el conjunto de reacciones químicas que le permiten a la célula sobrevivir. Esto es, el metabolismo celular.

d) **Ribosomas**, son los lugares donde se construyen las proteínas.

e) **ADN**, que es el material genético que controla la actividad celular. El ADN se encuentra formando una estructura circular, constituye el único cromosoma de la célula. Parece en una zona del citoplasma denominada nucleoide.

f) **Plásmidos**, pequeñas secuencias de ADN circular extra cromosómico que le confieren a la célula la capacidad de intercambiar material genético con otras células o resistencia frente a antibióticos.



Muchas bacterias poseen flagelos, que son estructuras que permiten que la célula se mueva. Otras bacterias presentan Pili que son estructuras rígidas que parten de la membrana celular. Sirven para que las células se conecten y así puedan transmitirse información.

Las algas cianofíceas, o cianobacterias, son células procariotas muy grandes, que contienen tilacoides en su interior. Éstos son unas bolsas membranosas que poseen clorofila. Con ella hacen la fotosíntesis.

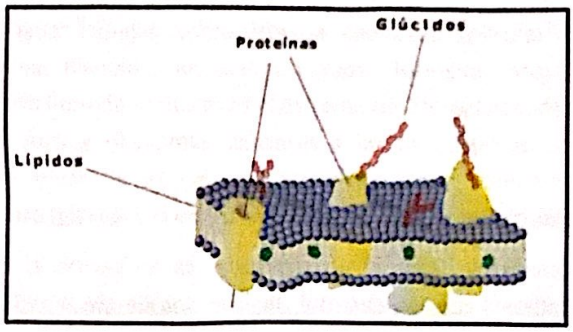
Scanned with CamScanner

3.2 LA CÉLULA EUCARIOTA

La célula eucariota tiene el material genético protegido por una membrana formando el núcleo, además en citoplasma aparecen unas estructuras denominadas orgánulos celulares que realizan distintas funciones.

Las partes de la célula eucariota son:

a) **Membrana plasmática:** Formada por lípidos, proteínas y una pequeña proporción de glúcidos. Los lípidos se organizan en dos capas e impiden el paso de cualquier sustancia polar. Las proteínas suelen situarse atravesando las dos capas de lípidos creando unos canales por donde se regula el paso de sustancias. Los glúcidos sólo se encuentran en el exterior de la membrana formando una capa que puede captar información del exterior. Es el límite celular, controla el paso de moléculas y recibe los estímulos producidos en el medio.



b) **Pared celular:** es una estructura dura y en algunos casos muy gruesa, formada por glúcidos como la celulosa. Es un esqueleto externo que proporciona una forma definida y estable a la célula. También impide que la célula se rompa cuando absorbe mucha agua. En las paredes aparecen pequeños poros para la entrada de agua, nutrientes y gases. Solo aparece en células vegetales.

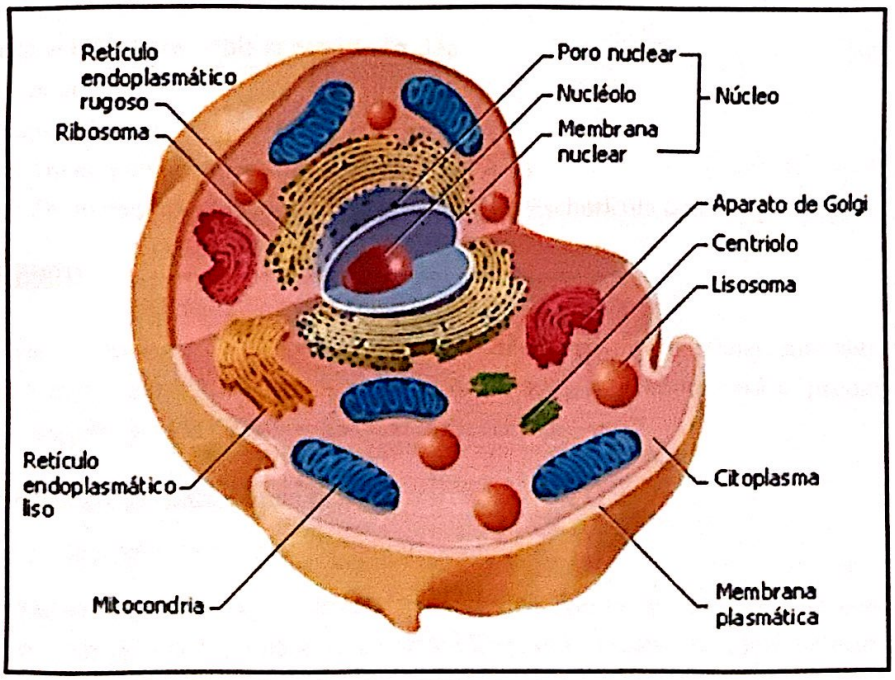
c) **Citoplasma:** se encuentra entre la membrana plasmática y el núcleo. En él se encuentran los orgánulos y el Citoesqueleto, incluidos en el hialoplasma.

- ✔ **Citoesqueleto:** estructura formada por proteínas. Es el esqueleto celular.
- ✓ **Ribosomas:** están formados por dos subunidades de ARN y proteínas. Sirven para la construcción de proteínas gracias a la información suministrada por el ARN mensajero.
- ✓ **Retículo endoplásmico:** orgánulo formado por túbulos contorneados y vesículas aplanadas o redondeadas. Se encuentran por todo el citoplasma relacionándose entre sí. Su función consiste en sintetizar, transformar, acumular y transportar sustancias. También forma vesículas que darán lugar a otros orgánulos de la célula. Existen dos tipos de retículo endoplásmico: I) Retículo endoplásmico rugoso, presenta aspecto rugoso por tener asociados ribosomas a la membrana del orgánulo. Su función es producir proteínas que actúen en el interior de una vesícula o en el exterior de la célula. II) Retículo endoplásmico liso, sin ribosomas. Su función es sintetizar lípidos.
- ✓ **Aparato de Golgi:** está formado por sacos y vesículas que provienen del retículo endoplásmico. En aparato de Golgi se transforman sustancias producidas en el retículo

Scanned with CamScanner

endoplásmico. También se generan vesículas que pueden unirse a la membrana, liberando su contenido al exterior, o bien dar origen a otros orgánulos.

- ✓ **Mitocondrias:** Son orgánulos grandes y ovalados, con doble membrana. La externa es lisa, la interna presenta repliegues denominados crestas. Se presentan en la célula en número variable pero son muy numerosas si la célula necesita consumir mucha energía. El interior de la mitocondria se llama matriz mitocondrial. En la matriz encontramos ADN circular, ARN y ribosomas, como las bacterias. Son capaces de formar proteínas y de dividirse. La función que realizan las mitocondrias es producir la mayor parte de la energía que necesita la célula, mediante procesos de oxidación de materia orgánica. Para ello, utiliza materia orgánica y oxígeno, liberando energía y dióxido de carbono. Este proceso se denomina respiración celular.
- ✓ **Cloroplastos:** Son orgánulos propios de la célula vegetal. Son grandes, con formas variadas y con doble membrana. La externa es lisa y a la interna se le asocian vesículas alargadas llamadas lamelas, sobre estas se depositan vesículas discoidales de color verde denominas tilacoides los que se agrupan formando pequeñas pilas llamadas grana. El espacio libre de vesículas es el estroma del cloroplasto, donde se encuentra el ADN circular, ARN y ribosomas, similares a las de bacterias. Los cloroplastos son orgánulos que utilizan la luz y el agua para transformar materia inorgánica (CO_2) en materia orgánica (glucosa). A este proceso se le conoce como fotosíntesis.
- ✓ **El núcleo:** es la estructura característica de la célula eucariota. Se distinguen las siguientes partes: I) Membrana nuclear, formada por dos membranas que provienen del retículo endoplásmico. Toda la superficie está salpicada de poros por los que entra y sale información. II) Nucleoplasma, similar al hialoplasma. III) Nucléolo, es una zona muy densa formada por ADN, ARN y proteínas. Es el lugar donde se forman los ribosomas IV) ADN, se encuentra condensado en forma de cromatina. El ADN contiene la información genética y controla la actividad celular.



Scanned with CamScanner

3.3 FUNCIONES CELULARES

- Función de nutrición. Consiste en la toma de nutrientes y posterior transformación para poder crecer, relacionarse o dividirse.
- Función de relación. Es el conjunto de procesos encaminados a generar una respuesta (tactismos) frente a los cambios producidos en el medio (estímulos).
- Función de reproducción. Corresponde a los mecanismos que establecen las células para dividirse con el fin de acrecentar su número de individuos de la especie.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

- ✓ Agua destilada
- ✓ Azul de metileno
- ✓ Kit de tinción Gram (cristal violeta, lugol, etanol al 95% y eosina)
- ✓ Kit de tinción de Wrigth (colorante Wrigth)

4.2 MATERIALES

- ✓ Portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Pisetas y Gotero
- ✓ Bisturí
- ✓ Beaker y Varillas
- ✓ Mechero
- ✓ Soporte de tinción
- ✓ Bajalenguas de madera
- ✓ Microscopios

4.3 MATERIALES BIOLÓGICOS

- ✓ Cebolla pequeña
- ✓ Planta acuática preferible la especie Elodea
- ✓ Papa pequeña
- ✓ Tomate pequeño
- ✓ Levadura de pan en polvo
- ✓ Solución de microorganismos Streptococcus sp. y Escherichia Coli

V. PROCEDIMIENTO

Se tomaran varias muestras de diferentes materiales biológicos entre células animales y vegetales, procariontes y eucariontes; para ello tendremos dos etapas, la primera será la preparación de las muestras y la segunda será la observación en el microscopio.

5.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Muestra 1: Epidermis de cebolla

Separar una capa de la cebolla, y extraer la membrana que la recubre. Esta se encuentra tanto dentro como fuera de la capa, separar una porción pequeña y extiéndala sobre un portaobjetos con una gota de agua. Si se desea ver con mayor claridad agregar una gota de lugol.

Scanned with CamScanner

- Muestra 2: Planta acuática (Elodea)

Desprenda una hoja joven (verde) cercana al extremo de crecimiento y póngala en un portaobjeto con una gota de agua (preferentemente el agua de su propio entorno, acuario)

- Muestra 3: Pulpa de papa

Con una cuchilla quítele la cascara a un pedazo de papa, a continuación saque porciones en forma de bastones. Luego haga un corte muy delgado, transparente en uno de los extremos y deposítelo sobre un portaobjetos, si se desea se puede hacer una observación en el microscopio previo al siguiente paso. Por ultimo agregar unas gotas de lugol.

- Muestra 4: Epidermis y pulpa de tomate

Para extraer la epidermis del tomate se desprende la cascara jalando de ella de tal forma que quede lo más delgada posible y si es necesario se raspara con un bisturí y lavara con agua hasta dejarla traslucida. En el caso de la pulpa se hizo un corte delgado el cual extenderemos en el portaobjeto.

- Muestra 5: Levadura

Disolver una pizca de levadura en 10 ml de agua corriente en un vaso de precipitados, calentar la muestra a 37°C aproximadamente y dejar reposar posteriormente colocar en un portaobjetos una gota de la solución anterior junto a una gota de azul de metileno.

- Muestra 6: Solución de microorganismos *Streptococcus sp.* y *Escherichia Coli*

Se colocara una gota en un portaobjeto y se fijara con fuego, luego se hará una tinción Gram con los siguientes pasos:

- ✓ Se agrega unas gotas de cristal violeta y se deja actuar por 1 minuto, lavar con agua suavemente.
- ✓ Poner unas gotas de lugol y dejar actuar 1 minuto, lavar suavemente.
- ✓ Agregar etanol por 20 segundos exactos y lavar con agua.
- ✓ Por último poner el segundo colorante que es la eosina por 30 segundos, lavar con agua y dejar secar para observar en el microscopio.

- Muestra 7: Frotis de mucosa bucal

Se coloca una gota de lugol en el portaobjeto, antes del raspado se hará 2 o 3 enjuagues bucales para evitar contaminantes, después realizaremos con un bajalenguas un raspado al interior de la mejilla o labio. Sumerja este bajalenguas en la solución de lugol.

- Muestra 8: Frotis de sangre

Se extraerá sangre de la punta del dedo meñique, primero se limpia la zona con alcohol y se realiza una punción con una lanceta estéril, dejar caer una gota de sangre en el extremo del portaobjeto (dejar caer las 2 primeras gotas), con otro portaobjeto se realizara un frotis y se dejara secar 3 min.

Posteriormente haremos una tinción Wrigth la cual tiene los siguientes pasos:

- ✓ Cubrir la lámina por completo con el colorante wrigth.
- ✓ Agregar unas gotas de agua sin lavar por completo el colorante, en este paso se debe esperar hasta ver como se forma una película dorada y se cronometra 5 minutos.
- ✓ Lavar la lámina con agua y dejar secar para su posterior observación

Scanned with CamScanner

5.2 OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

Para cada muestra viva se debe poner un cubre objetos procurando que no se formen burbujas. Se colocara el portaobjetos en la platina del microscopio y se observara primero con el objetivo de menor aumento, se va subiendo el aumento hasta llegar los 100X, aunque previamente a esta medida se debe colocar unas gotas de aceite de inmersión.

VI. RESULTADOS

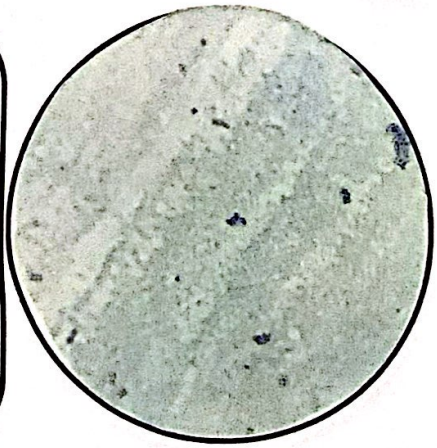
Escriba lo observado y señale cada parte de las células que se pueda dentro de las fotos tomadas en los microscopios. Además clasifique las muestras por células eucariotas o procariotas y células vegetales o animales.

Cebolla

Primero se quito 3 capas y en la 4 estaba la epidermis (transparente), luego se coloco en el portaobjetos una capa. en 4x.
- Observamos la epidermis
- su pared celular
- dentro de cada célula observamos pequeños puntitos que son el núcleo.
- muestra de célula vegetal

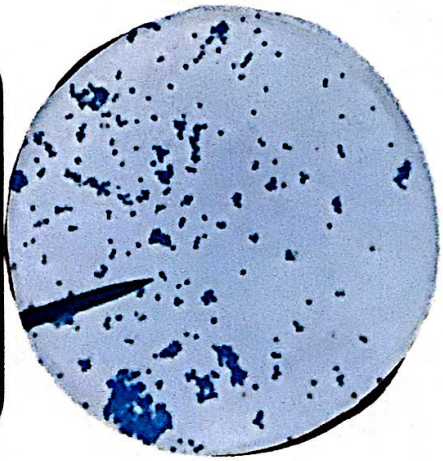
Sangre

- Se utilizó solo 1ml (2 gotas)
- se puso sobre el portaobjectos.
- se tiñó con tinción Wright por 5 min.
- secar porta objetos con mecho
- se vió la presencia de eritrocitos (mayor cant.) y leucocitos.
- visión general de la muestra



levadura

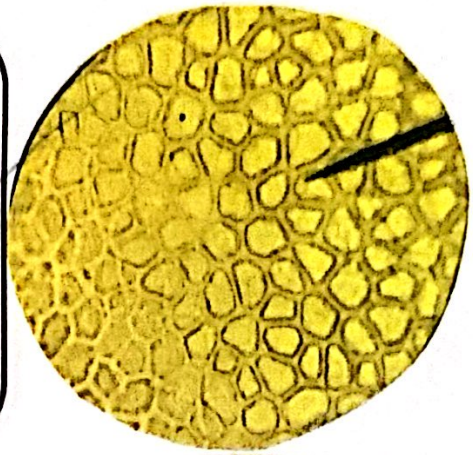
- se aplicó con azul de metileno
- Primero se hirvió por 10 minutos en la estufa de incubación para levadura y se observó las células.
- algunas estaban aporenaose
- 10x.
- Es una procariota.



Scanned with CamScanner

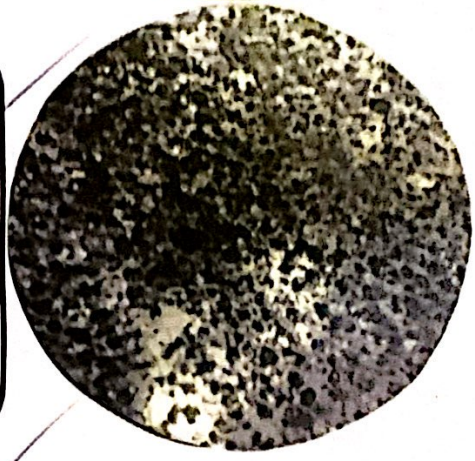
Tomate (epidermis)

- se tomó la muestra de la pulpa del tomate y se hizo un corte fino en el portaobjetos, se observó en 4x
- vimos células en la pared celular
- vimos el núcleo
- Vista en 40X.
- citoplasma



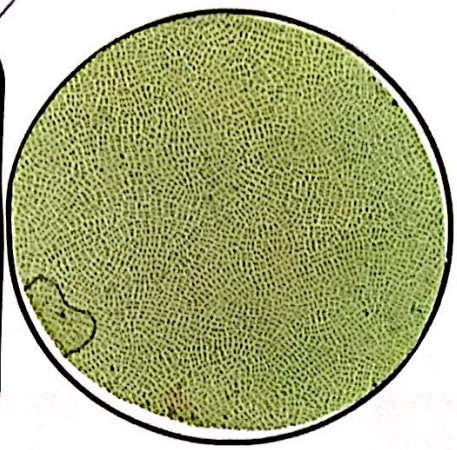
Papa cruda

- microscopio en 4x, 10x
- se usó lugol para ver más fácil las celulas
- las células de las papa
- no se distinguian muy bien
- sus estructuras vegetales almacenan almidón



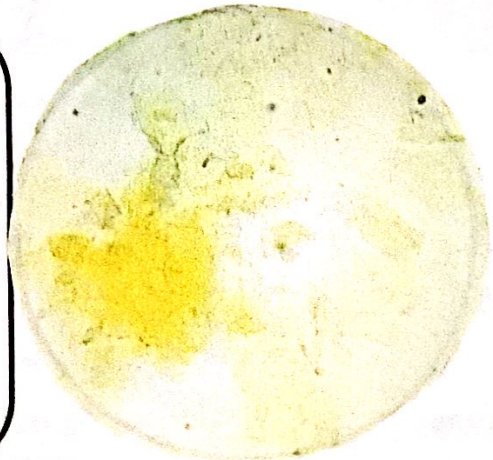
Alga.

- 10x.
- se observó pequeños núcleos
- algunos divididos
- se clasifica como Procariota y Eucariota
- algunos en fase de reproducción
- en la célula vegetal se puede observar su pared celular y escasos organelas



Saliva (mucosa bucal)

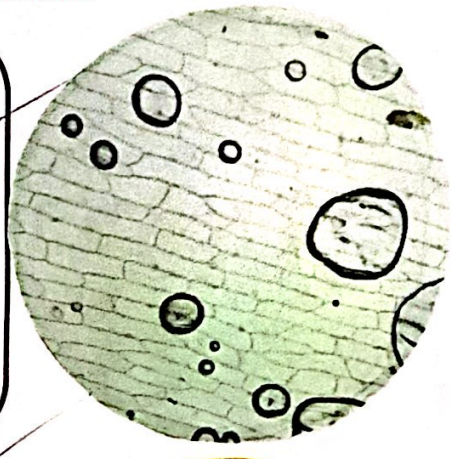
- muestra de raspado bucal
- se observó las celulas epiteliales escamosas
- no se observa el núcleo con claridad
- celulas que secubren a la mucosa
- se ve citoplasma, pequeños puntos que parecen bacterias



Scanned with CamScanner

Cebolla 40x

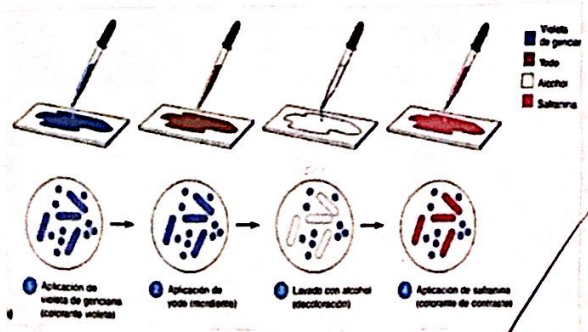
- Presencia más clara de su pared celular y los puntitos al medio son el núcleo
- Se observaron vacuolas de gran tamaño
- las células de la cebolla son útiles para el estudio de la división celular ya que es fácil de observar las fases de mitosis.

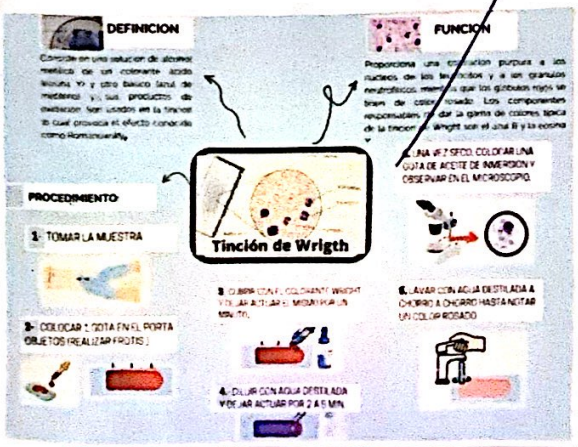


Tomate en 40x.

- Se observó la pared celular (membrana)
- Contienen cloroplastos.
- es una célula vegetal
- se hizo un corte con bisturí fino y luego se echó lugol.
- se visualiza su citoplasma y núcleo.

Grafique los pasos de las tinciones de Gram y Wrigth:





Tinción de Gram

- Se pone la muestra al portaobjetos luego se calienta suavemente para la fijación de células.
- Se cubre la mezcla con cristal violeta que tiñe el
- luego se enjuaga el exceso de cristal nuevamente con alcohol.
- se añade safranina y se observa el resultado

Tinción de Wright

- Se extiende una muestra, colocando 1 gota de sangre haciendo el frotis en el portaobjeto dejando secar.
- Se sumerge en metanol para fijar células.
- Se cubre con la solución colorante de Wrigth
- Enjuagar con agua destilada
- Una vez seco se le coloca 1 gota de aceite de immersión y observar.

Scanned with CamScanner

VII. CONCLUSIONES

La célula es la unidad básica y fundamental más importante de los seres vivos, gracias a su estudio se ha podido aprender su composición y sus diversas formas y organelas que poseen.

Se define como: unidad funcional: todo proceso de los seres vivos son llevados a cabo por las células (alimentación, respiración...)

Estos se clasifican en EUCARIOTAS y PROCARIOTAS; las EUCARIOTAS se clasifican por tener núcleo y estar envueltos por una membrana, en cambio los procariotas no tienen núcleo.
Algo característica de las células es el citoplasma, citoesqueleto, RER, Aparato de golgi (empaqueta mols) mitocondrias (también contienen su propio material genético), membranacelular, ribosomas (en el RER o citoplasma) y finalmente el núcleo que contiene ADN (es el centro de control)

VIII. DISCUSIÓN

La célula es la unidad estructural y fundamental y básica de la vida, estos pueden estar aislados o agrupados formando organismos pluricelulares.
Las células PROCARIOTAS no tienen núcleo ni poseen compartimentos internos rodeados por membranas; y las células EUCARIOTAS si poseen núcleo y varios orgánelos internos.

Las células procariotas y eucariotas son un conjunto de moléculas muy bien estructuradas y que tienen en su interior varios compartimentos y una de las más características es la membrana plasmática, el cual tiene la función de proteger a la célula y ser semipermeable; separando el exterior del interior de la célula.

Las células vegetales son de mayor tamaño que las células animales que están envueltas por una pared celular de forma poligonal.

Scanned with CamScanner

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. ¿Qué es una célula? [Internet]. Medlineplus.gov. [citado el 3 de abril de 2024]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/genetica/entender/basicalcelula.

2. Membrana plasmática - Concepto, estructura y funciones. [citado el 3 de abril del 2024]. Disponible en: https://concepto.de/membrana-plasmatica/.

X. ACTIVIDADES

1) Indique las diferencias entre células vegetales y animal, además mencione los tipos de organelos que las diferencian.

Célula vegetal	Célula animal
• Posee pared celular y cloroplasto • Solamente en plantas/algas • Tienen vacuolas • Los centriolos están ausentes. • los lisosomas no son tan comunes • Su citoesqueleto es menos complejo debido a la rigidez de la pared celular. • Su forma de almacenamiento de carbohidratos es el almidón. • Su metabolismo es realizar fotosíntesis en cloroplastos • la división celular es por la formación de la placa celular durante la citocinesis.	• No tiene pared celular ni cloroplasto • Está en animales, protozoos, y amebas. • No tienen vacuolas (hay excepción) • Poseen centriolos y lisosomas están muy presentes • El citoesqueleto es mas complejo. • la forma de almacenamiento de carbohidratos se da por el glucógeno. • no realizan fotosíntesis como la célula vegetal. • se forma el surco de división celular durante la citocinesis.

2) Mencione los tipos de organelos que contienen ADN y ARN respectivamente:

ADN: Núcleo y Mitocondria, cloroplastos

ARN: Ribosoma y Citoplasma, RER

Scanned with CamScanner

3) Diga 3 diferencias y 3 semejanzas entre las células procariontes y las células eucariontes.

Célula Procarionte	Célula Eucarionte
DIFERENCIAS • Este tipo de célula no posee núcleo, sus organismos solo son las bacterias y algas. • Su membrana plasmática separa del medio donde viven y controla el paso de sustancias, hijos el ADN. • Son simples y pequeños, su ADN forman una sola larga cadena que se enrosca en sí misma.	**DIFERENCIAS** • Si contiene núcleo, y en su citoplasma tiene varios organulos importantes. • Su membrana plasmática está formada por proteínas y lípidos, este último impide el paso de cualquier sustancia. • Tienen varios cromosomas, ADN y proteína.
SEMEJANZAS • Los dos tienen ADN como material genético que están rodeados por membrana plasmática. • los ribosomas que tienen sirven para la síntesis de proteínas. • también poseen citoplasma donde ocurren las reacciones bioquímicos.	**SEMEJANZAS** • comparten características similares como: - ADN, membrana plasmática, citoplasma, ribosoma. • tienen ribosomas que están presentes para la síntesis de proteínas • tienen citoplasma.

4) Mencione la función principal con una palabra, de los siguientes organelos:

Organelos	Función
Membrana Plasmática	Sustancias
Pared Celular	Impide
Citoesqueleto	Soporte
Retículo Endoplásmico Rugoso	Producir proteína
Retículo Endoplásmico Liso	Síntesis lípido
Mitocondria	Energía
Núcleo	Control
Nucléolo	Producción
Cilios	Extraen
Flagelo	Movimiento

Organelos	Función
Complejo de Golgi	Ayudante
Lisosomas	Reciclo
Peroxisomas	Rompe ácidos
Ribosomas	Construcción de proteína
Vacuola	Equilibra
Cloroplasto	Fotosíntesis
Cromosoma	transportadores
Centriolo	Organizar
Membrana nuclear	Separador

Scanned with CamScanner

Li et al. Animal Diseases (2021) 1:28
https://doi.org/10.1186/s44149-021-00003-9

Animal Diseases

ORIGINAL ARTICLE Open Access

Toxoplasma gondii adhesion and apoptosis of chicken erythrocytes

Chenghuan Li[1†], Xiaohan Zhang[1†], Xiaoyu Sang[1†], Yanhong He[1], Saeed El-Ashram[2], Yingying Ding[1], Tiantian Jiang[3] and Na Yang[1*]

Abstract

Toxoplasma gondii is thought to infect all nucleated cells in warm-blooded animals, including poultry, mammals, and humans. However, it is unclear whether *T. gondii* can infect chicken erythrocytes due to the nucleated nature of these cells. Due to the special role of chicken erythrocytes in innate immunity, we investigated the cell–cell interaction between *T. gondii* and erythrocytes to elucidate the role of chicken erythrocytes in *T. gondii* infection. Cellular apoptosis was analyzed by transwell assay and flow cytometry. An immunofluorescence method was used to examine the reorganization of vimentin during *T. gondii* infection in both Vero cells and chicken erythrocytes. The reorganization of actin was evaluated to further examine the invasion capacity of tachyzoites on chicken erythrocytes during infection. We discovered that *T. gondii* can adhere to but not invade chicken erythrocytes and eventually cause apoptosis in chicken erythrocytes. When tachyzoites were cocultured with chicken erythrocytes in vitro, the transcriptional levels of *T. gondii* MIC 3, ROP16, and ROP18 were significantly decreased. In addition, the rearrangement of host cell vimentin, a type III cytoskeleton protein regulated by *T. gondii* infection, was not observed. Similarly, the parasite-induced ring-shaped actin structure was not formed in the host parasite junction. *T. gondii* (RH strain) tachyzoites preferentially invaded Vero cells and replicated in chicken blood monocytes, but they were not found in chicken erythrocytes. These findings showed that although *T. gondii* could attach to the surface of chicken erythrocytes, but couldn't invade successfully. Interestingly, we found that the *T. gondii* secretome, lysates, and intact tachyzoites could cause apoptosis of chicken erythrocytes, which suggested a complex mechanism involved in the apoptosis of chicken erythrocytes induced by *T. gondii*. This study elucidated that *T. gondii* could not infect nucleated chicken erythrocytes and enriched our understanding of the transmission mechanism of *T. gondii* among avian species.

Keywords *Toxoplasma gondii*, Chicken erythrocytes, Invasion, Apoptosis

Conclusion

This study revealed that *T. gondii* cannot infect nucleated chicken erythrocytes and increased our knowledge of the transmission mechanism of *T. gondii* across avian species.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°4

CROMOSOMAS, BANDEO CROMOSOMICO Y CARIOTIPOS

I. OBJETIVO

- ✓ Aprender sobre la división celular y la ubicación del ADN dentro de este proceso
- ✓ Aprender sobre los cromosomas, sus partes y su clasificación
- ✓ Aprender sobre los cariotipos y sus usos en la detección de enfermedades
- ✓ Aprender a hacer un cariotipo a partir de un idiograma → identifica pares de cromosomas.

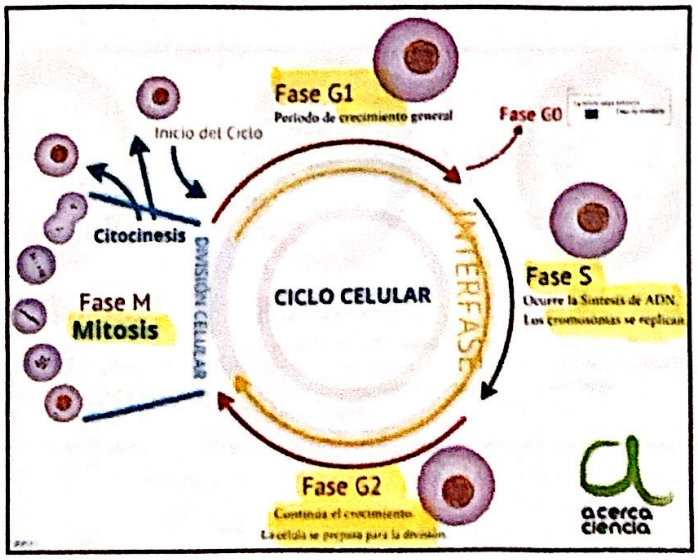
II. INTRODUCCION

En el curso de su vida todas las células pasan fundamentalmente por dos períodos: uno, de interfase o de no división (de reposo aparente) y otro de división por medio del cual se producen 2 células hijas. Existen células que tienen ciclos breves de vida y se dividen muy a menudo, mientras que otras poseen períodos muy largos.
↳ mitosis .

Las características de las células están codificadas en su ADN el cual es parte importante dentro del proceso de división y su propia duplicación es un fenómeno muy estudiado. Para poder sintetizar todo el ADN y trasladar las copias a las 2 células hijas, este se repliega y condensa en cuerpos llamados CROMOSOMAS. Estos cromosomas igualmente son un objeto de estudio muy importante puesto que pueden ser visibles, a diferencia del ADN, mediante microscopio y así ver las anormalidades que ocasionalmente presentan por la mala duplicación de la información genética.

III. MARCO TEORICO

El ciclo celular puede considerarse como una compleja serie de fenómenos, mediante los cuales el material celular se distribuye en las células hijas. Antes de que la célula se divida por mitosis, sus principales componentes ya se han duplicado. Por ejemplo, en un cultivo de tejido de mamíferos, en una célula que se divide en 16 horas la distribución en tiempo es aproximadamente la siguiente: G1 = 5 horas, S= 7 horas, G2 = 3 horas y la mitosis = 1 hora.



Scanned with CamScanner

El período más variable es G1 y puede durar días, meses o años .Generalmente las células nerviosas y del músculo esquelético se encuentran en G1. La célula sale del ciclo celular durante la fase de G1 y se queda detenida en un estado quiescente llamado G0. Muchas células del organismo adulto (células nerviosas del lente del ojo y del músculo estriado) no se dividen nunca, en tanto, los fibroblastos que participan en la regeneración de las heridas crecen y se dividen al ser solicitado esto por el organismo, de otro modo, permanecen en estado quiescente, justo antes de la síntesis de ADN. En cultivo, las células son llevadas a G0 mediante la privación de factores nutricionales.

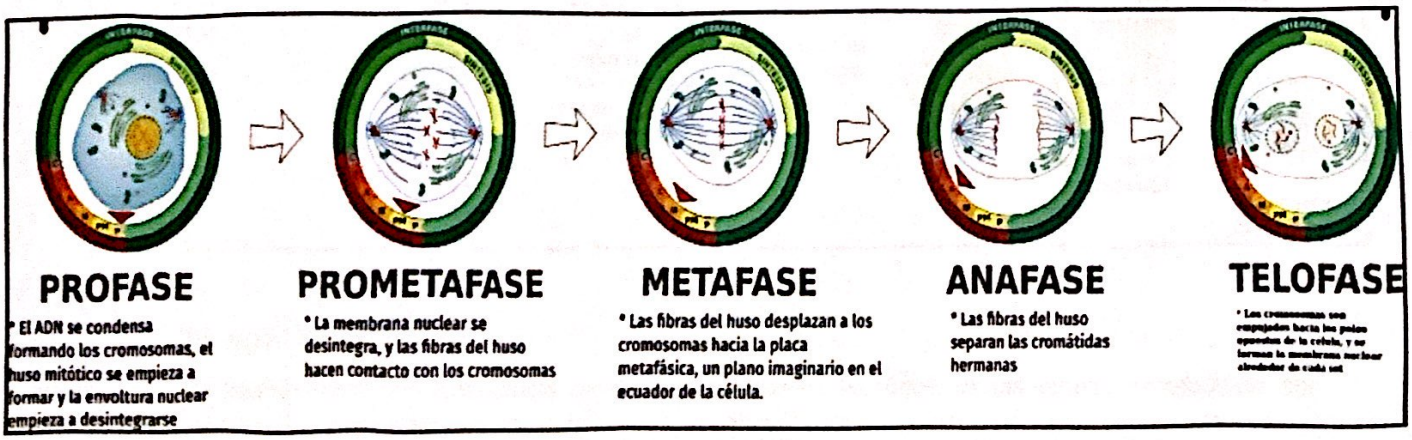
La duplicación del ADN ocurre en un período de la interfase denominado período sintético o "S". Los cromosomas se hacen visibles en determinadas fases de la división celular, pero no lo son en la interfase en la cual se encuentran en estado de hidratación.

Los organismos que se reproducen sexualmente se desarrollan a partir de una célula única, el cigoto, el cual resulta de la unión del óvulo y el espermatozoide en el proceso de fecundación. En las células somáticas de un individuo, los cromosomas se presentan en pares, un miembro de cada par es originario de un progenitor y el otro miembro del otro progenitor. Los miembros de un par de cromosomas se denominan homólogos. El número diploide de cromosomas se conserva durante las sucesivas divisiones nucleares que tienen lugar en el crecimiento y desarrollo de un organismo multicelular en el proceso de mitosis.

3.1 MITOSIS.

La mitosis comprende una serie de fases: profase, metafase, anafase y telofase. Los cromosomas se duplican individualmente en la interfase. En la profase temprana, los cromosomas aparecen como filamentos extendidos y delgados.

- En la profase temprana, los cromosomas aparecen como filamentos extendidos y delgado, al final de la profase se compactan por el empaquetamiento de las fibras nucleoproteínicas.
- En la metafase se produce un huso entre los dos centriolos y los cromosomas van a formar la placa ecuatorial.
- En el anafase cada cromosoma hijo se separa para ir al polo correspondiente.
- En la telofase, se forman dos núcleos a partir de cada uno de los dos grupos polares de cromosomas hijos.



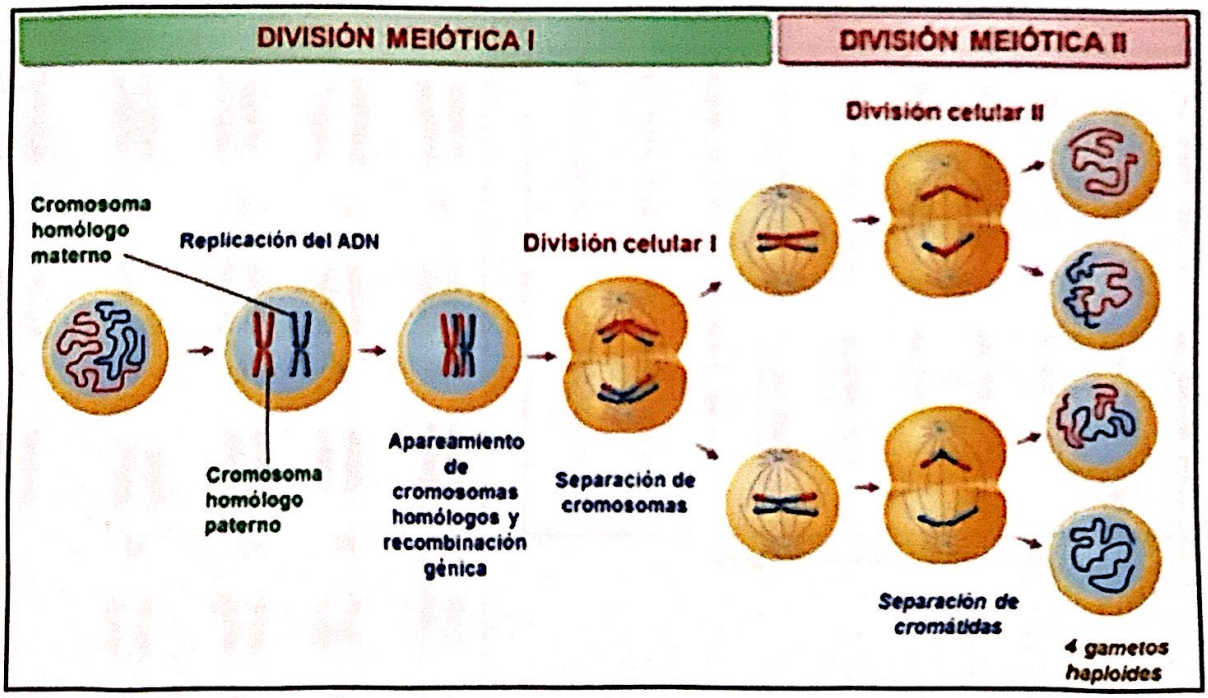
Scanned with CamScanner

3.2 MEIOSIS.

Si los gametos (óvulo y espermatozoide) fueran también diploides, el cigoto resultante, tendría el doble del número diploide de cromosomas. Para evitar esto, los gametos experimentan un tipo especial de división celular, la meiosis en la cual el número diploide se reduce a haploide.

El proceso meiótico es característico de todos los vegetales y animales que se reproducen sexualmente y tiene lugar en el curso de la gametogénesis.

- La reducción del número de cromosomas ocurre mediante dos divisiones nucleares que sólo involucran una única división de los cromosomas. Estas se conocen como primera y segunda división meióticas.
- La esencia del proceso es simple: Los cromosomas homólogos se aparean y forman tétrada o bivalente. Una tétrada posee cuatro cromátidas. Pueden intercambiarse porciones de estas cromátidas apareadas de un cromosoma homólogo al otro, lo cual da lugar a figuras con entrecruzamientos que se denomina crossing–over.
- En la metafase I, los bivalentes se disponen sobre el huso y en la anafase I, cada cromosoma homólogo, con sus cromátidas asociadas van a los polos opuestos.
- Después de un corto período de intercambio, las dos cromátidas de cada homólogo se separan en la segunda división meiótica, de modo que las cuatro cromátidas ahora están distribuidas en cada uno de los cuatro gametos.



3.3 LOS CROMOSOMAS

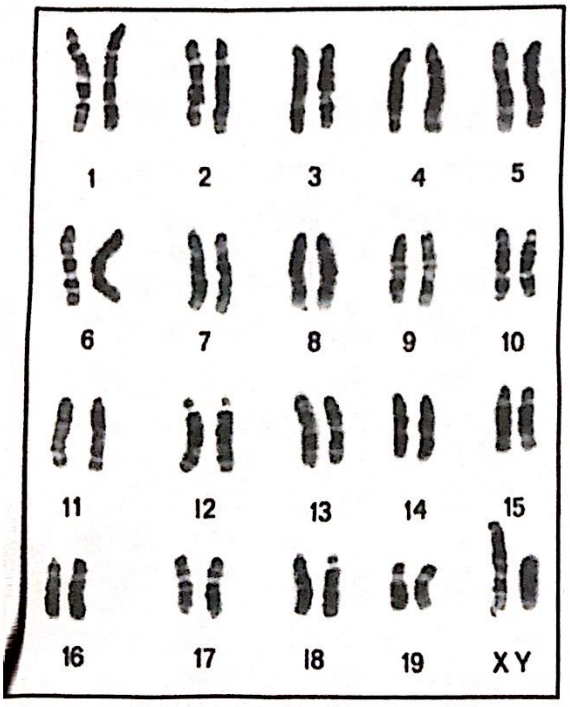
Los cromosomas son estructuras complejas ubicadas en el núcleo de las células, compuestos por cromatina. La cromatina es el conjunto de ADN (35 %), histonas (35 %), otras proteínas no histónicas (20 %) y ARN (10 %). Un cromosoma es la estructura que resulta del empaquetamiento del ADN y las proteínas previo a la división celular para su segregación posterior en las células hijas.

Scanned with CamScanner

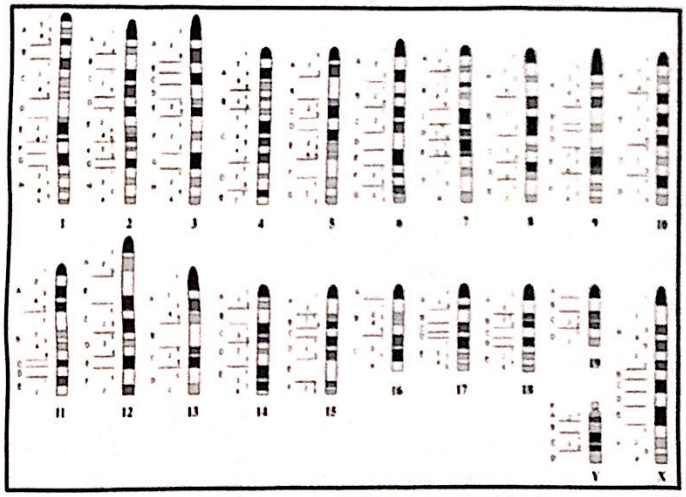
a) **Morfología del cromosoma metafásico** Los cromosomas se ven como estructuras delgadas y alargadas. Tienen un *brazo* corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada *centrómero*. El brazo corto se designa como *p* y el largo como *q*. El centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral del cromosoma. Es esencial para el movimiento y segregación normales del cromosoma durante la división celular.

- Las **cromátidas** son estructuras idénticas en morfología e información ya que contienen cada una 1 molécula de ADN. Las cromátidas están unidas por el centrómero. Morfológicamente se puede decir que el cromosoma es el conjunto de dos cromátidas y genéticamente cada cromátida tiene el valor de un cromosoma.
- Los **telómeros** son los extremos de cada brazo del cromosoma. El ADN de los telómeros no se transcribe.

b) **Cariotipo** Se llama cariotipo al número, forma y tamaño de los cromosomas de una determinada especie. Esto es, al conjunto de los cromosomas de una célula. Los cromosomas de una célula pueden ser observados al microscopio óptico, fotografiados y sobre estas fotografías pueden contarse y medirse con toda facilidad. Los cromosomas pueden recortarse de la fotografía y ordenarse por su tamaño, de mayor a menor, y por la posición del centrómero. Esta distribución ordenada de los cromosomas recibe el nombre de idiograma.



Cariotipo del ratón (*Mus musculus*)



Ideograma del ratón (*Mus musculus*)

El número de cromosomas de las células somáticas siempre son par, ya que cada célula somática dispone de dos juegos de cromosomas y cada cromosoma de una serie tiene su homólogo en la otra. Los cromosomas homólogos provienen cada uno de un progenitor. Es por esto que contienen información para los mismos caracteres pero no necesariamente la misma información, pues uno de los progenitores ha podido aportar un alelo para un gen y el otro progenitor otro.

Scanned with CamScanner

El número de cromosomas de cada serie recibe el nombre de número haploide o n y ha sido heredado de uno de los progenitores. El número total de cromosomas es el número diploide o 2n. Así, en el ratón n=20 y 2n=40.

NUMERO CROMOSÓMICO DE ALGUNAS ESPECIES

Nombre científico	Descripción	2n
Drosophila melanogaster	Mosca del vinagre	8
Zea Mays	Maíz	20
Triticum dicoccum	Trigo para pasta	28
Triticum aestivum	Trigo para pan	42
Triticum monococcum	Trigo escaña menor	14
Soghum sp	Sorgo	10,20,40
Spinacea oleracea	Espinaca	12
Allium cepa	Cebolla	16
Raphanus sativus	Rábano	18
Columbia livia	Paloma	80
Canis familiaria	Perro	78
Gallus domesticus	Gallo	78
Equus caballus	Caballo	64
Homo sapiens	Hombre	46
Ascaris megalocefala	Un nematodo	2
Lysandra nivescens	Un lepidóptero	380

En los mamíferos los cariotipos del macho y de la hembra son diferentes. La hembra tiene dos cromosomas X (XX-homogamética) y el macho tiene un cromosoma X y otro Y (heterogamético–XY). Estos cromosomas que determinan el sexo se llaman, sexuales. El resto de los cromosomas se denominan autosomas. En las aves es al contrario, el macho es homogamético (ZZ) y la hembra heterogamética (ZW).

3.4 DETERMINACIÓN DEL SEXO

En las últimas décadas las investigaciones sobre biología molecular y genética han ampliado el concepto que tradicionalmente se tiene sobre la determinación del sexo. En los mamíferos la determinación sexual primaria es estrictamente cromosómica. La combinación XX o XY es la responsable del sexo genético, en la que el sexo homogamético es el femenino (XX) y el sexo heterogamético es el masculino (XY).

Durante la gametogénesis (formación de las gametas, que poseen un solo conjunto de cromosomas, o sea, son haploides) las hembras producen óvulos que llevan un cromosoma X; en cambio, en los machos, la mitad de los espermatozoides tienen un cromosoma X y la otra mitad, un cromosoma Y. La presencia de un cromosoma Y hace que un embrión se diferencie como macho y se desarrollen testículos y no ovarios. Este hecho indica que existen genes propios del sexo masculino en el cromosoma Y, que no están presentes en el X.

Durante mucho tiempo se ha buscado un gen que se exprese en un factor determinante de los testículos **(TDF, testis-determining factor)**, que actúe como un interruptor sexual en el cromosoma Y e inicie la masculinidad. Los embriólogos habían descubierto que durante el primer mes del desarrollo embrionario en los seres humanos (y de alrededor de 11 días en el ratón), las gónadas que se forman no son testículos ni ovarios, sino de sexo indeterminado. Aproximadamente hacia las seis o siete semanas de desarrollo en el humano las gónadas se convierten en ovarios o bien en testículos.

En 1991, Lovell-Badge y Goddfellow y sus colaboradores en Inglaterra aislaron un gen denominado SRY **(sex determining region Y)**. El gen Sry se ha identificado como el factor determinante de los

Scanned with CamScanner

testículos, porque cuando se inyecta en ratones hembras normales (XX) hace que se desarrollen como machos. Aunque estos machos XX son estériles, parecen machos normales en cualquier otro aspecto. El gen SRY activa la proteína sf-1 que posee gran importancia en el desarrollo testicular y en la regulación de la hormona antimulleriana (que participa en la diferenciación masculina). Para que un embrión se diferencie como de sexo masculino es no obstante necesaria, pero no suficiente, la presencia del gen SRY. El desarrollo testicular dependerá de una serie de sucesos en los que interactúa el gen SRY con genes autosómicos y otros ligados al cromosoma X. En forma inversa, la ausencia del gen SRY permitirá el desarrollo de los ovarios mediante una secuencia en la que participarían los mismos genes autosómicos y del cromosoma X que actuarían en el macho.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

- ✓ Placa metafásica (fotocopia).
- ✓ Hoja con modelos de cromosomas
- ✓ Ficha de montaje de cariotipo
- ✓ Pegamento y tijeras

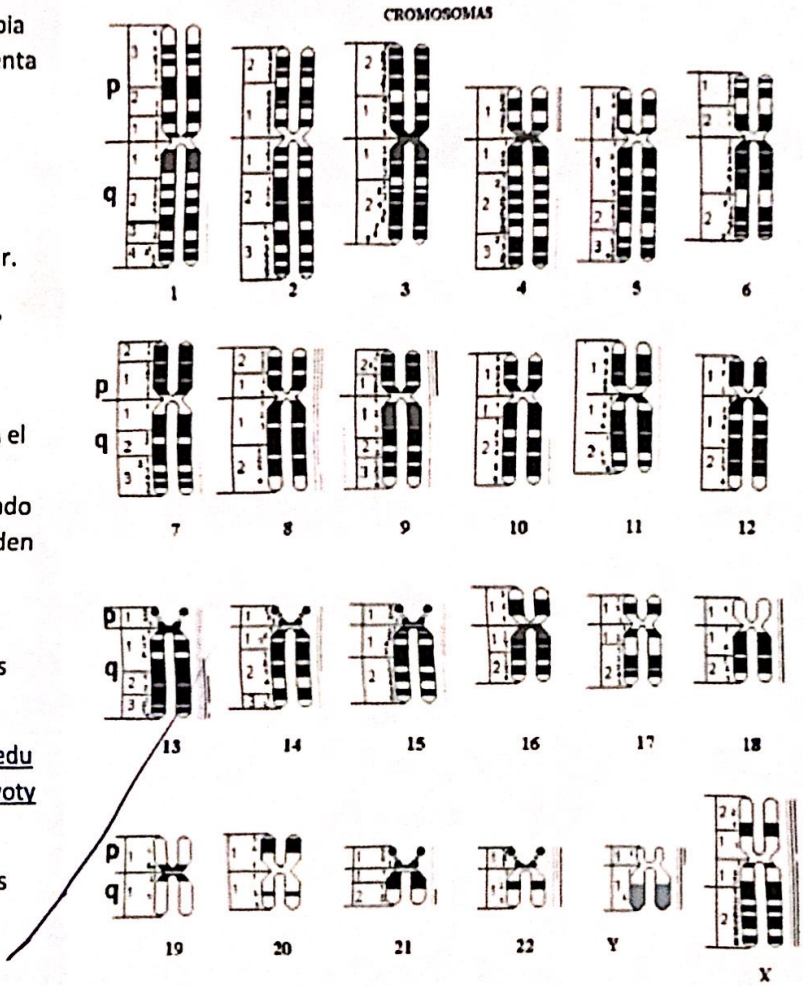
V. PROCEDIMIENTO

1. Divide en áreas la fotocopia de placa metafásica y cuenta los cromosomas de cada área. Anota
2. Recorta los cromosomas homólogos dejando un delgado borde rectangular.
3. Buscar en la hoja modelo, idiograma, el par al que corresponden.
4. Pegar el par homólogo en el Nº correspondiente de la Ficha de Cariotipo, cuidando que los centrómeros queden sobre la línea dibujada, como se ilustra.

PARTE II: realizar los ejercicios de la página:

http://www.biologia.arizona.edu/human/act/karyotyping/karyotyping.html

Colocar los diagnósticos de los pacientes A, B y C en las conclusiones.



Scanned with CamScanner

La Historia Médica del Paciente A

Paciente A es el feto casi completamente desarrollado de una mujer de cuarenta años. Los cromosomas fueron obtenidos de las células epiteliales. Las células fueron adquiridas por el amniocentisis.

El Cariotipo del Paciente A

Interpretar el cariotipo

A1. Cual notación usarías para caracterizar el cariotipo del paciente A?

47, XX, +21 -> paciente tiene 47 cromosomas, es femenina y tiene un cromosoma 21 extra

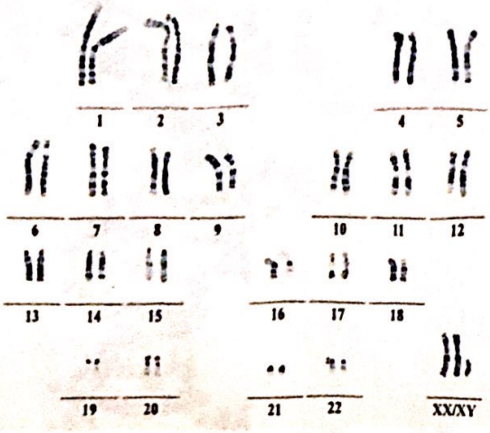
A2. ¿Que diagnostico darías?

El sindrome de Down.

La Historia Médica del Paciente B

Paciente B es un hombre de 28 años que está tratando de identificar la causa por su infertilidad. Los cromasomas fueron obtenidos de células nucleadas de su sangre

El Cariotipo del Paciente B



Interpretar el cariotipo

B1. ¿Qué notación usarías para caracterizar el cariotipo del paciente B?

47, XXY -> paciente con un cromosoma sexual extra.

B2. ¿Que diagnóstico darías al paciente B?

El sindrome de Klinefelter.

La Historica Médica del Paciente C

Paciente C se murió a poco de su nacimiento con muchas anomalías incluyendo el polidactilia y un labio leporino. Los cromosomas fueron obtenidos de una muestra de tejido.

El Cariotipo del Paciente C

Interpretar el cariotipo.

C1. ¿Qué notación usarías para caracterizar el cariotipo del paciente C?

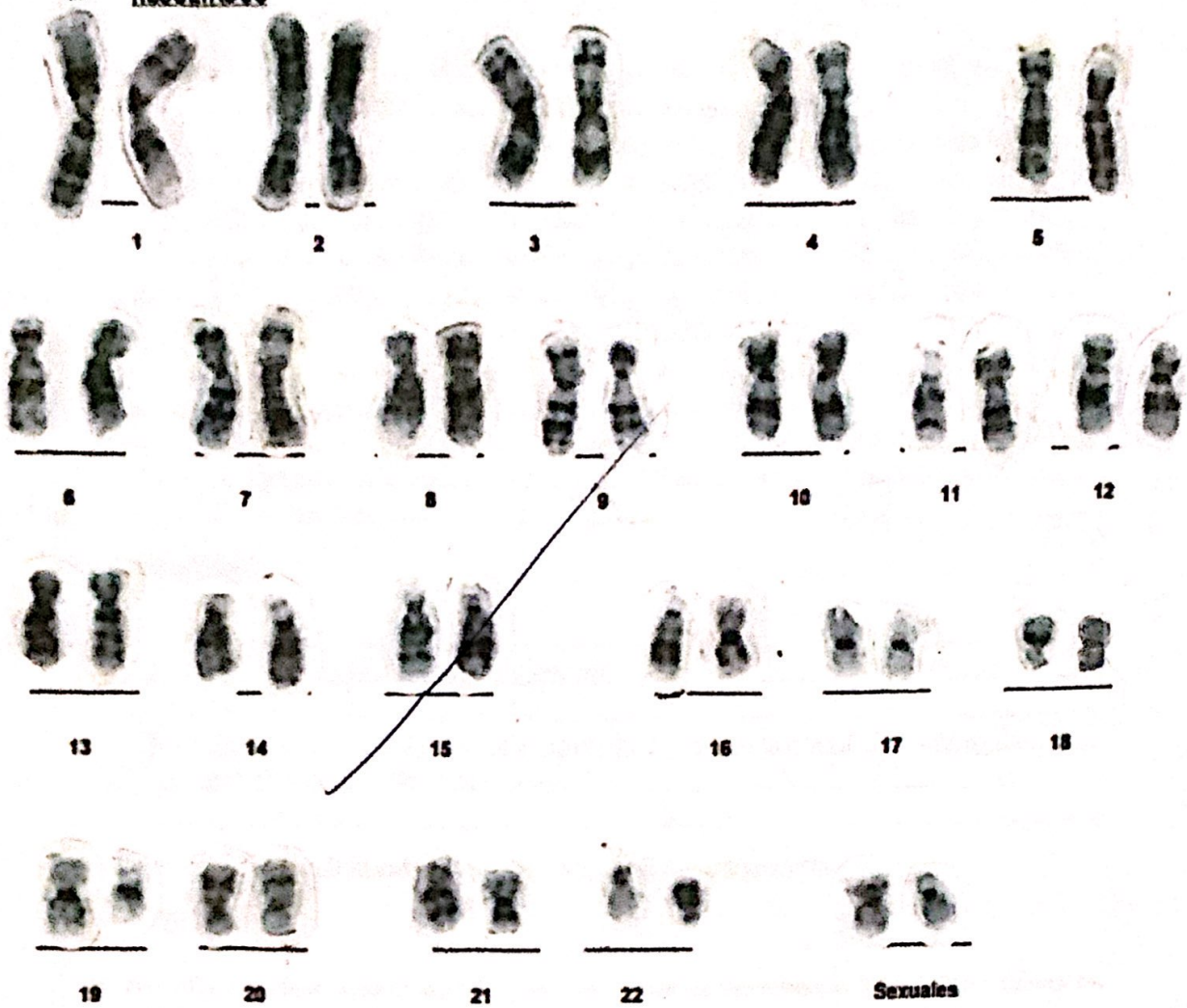
47, XY, +13 -> paciente con 47 cromosomas, es masculino y tiene cromosoma extra en el 13.

C2. ¿Que diagnóstico darías al paciente C?

Sindrome de Trisomia 13.

Scanned with CamScanner

VI RESULTADOS



VII. CONCLUSIONES

- Los cromosomas son estructuras que se encuentran dentro de las células y que contienen los genes de una persona y en conunidad son denominado cariotipo.
- Para realizar una síntesis de todo el ADN, este se condensa y repliega en los cromosomas.
- Antes de que la célula pase a la mitosis que tiene 4 fases que son la •Profase, Metafase, Anafase y Telofase, los principales componentes de la cel. ya se duplicaron.
- Los cromosomas si son visibles ya que se necesita ver los para ver si presentan alguna anormalidad

Scanned with CamScanner

VIII. DISCUSIÓN

En la vida de los seres vivos, existe la célula, la cual la tenemos todo ser viviente incluyendo bacterias; la célula pasa por dos fases: Interfase (donde se produce el crecimiento, replicación de ADN y preparación de la célula para la próxima fase que es la mitosis) y la segunda fase es la mitosis donde la célula se dividirá en 2 células hijas iguales genéticamente y posteriormente o ese pasará por 4 periodos (Profase, Metafase, Anafase y Telofase). Los cromosomas son estructuras dentro de la célula y contienen genes (ADN); existen dos cromosomas sexuales X e Y; el proceso meiótica es característica de todos los vegetales y animales que se reproducen sexualmente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

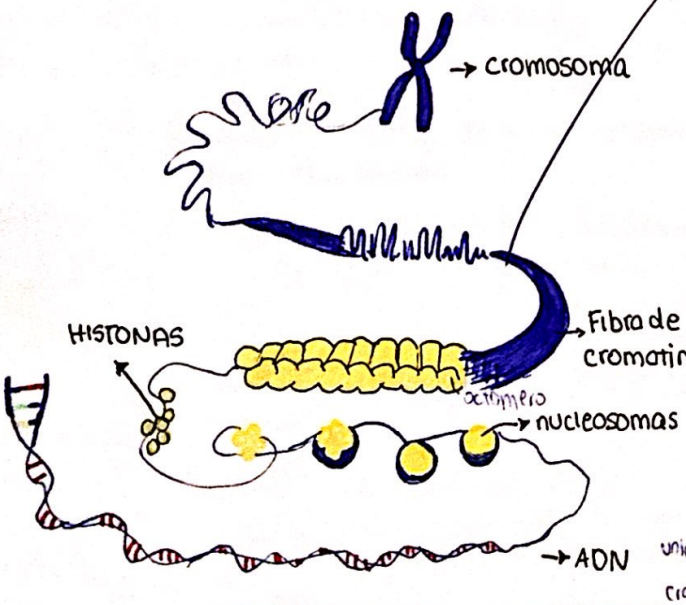
1. https://www.ucm.es/genética//apuntes de genetica

2. https://www.elsevier.com/es-es/connect/anatomia-y-estructura-de-la-celula.

- https://webs.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/cariotipo/cario.htm

X. ACTIVIDADES

1) **Describa y grafique a partir del DNA como se forman los cromosomas (teniendo en cuenta las histonas, octameros y nucleosomas) y explique su estructura.**

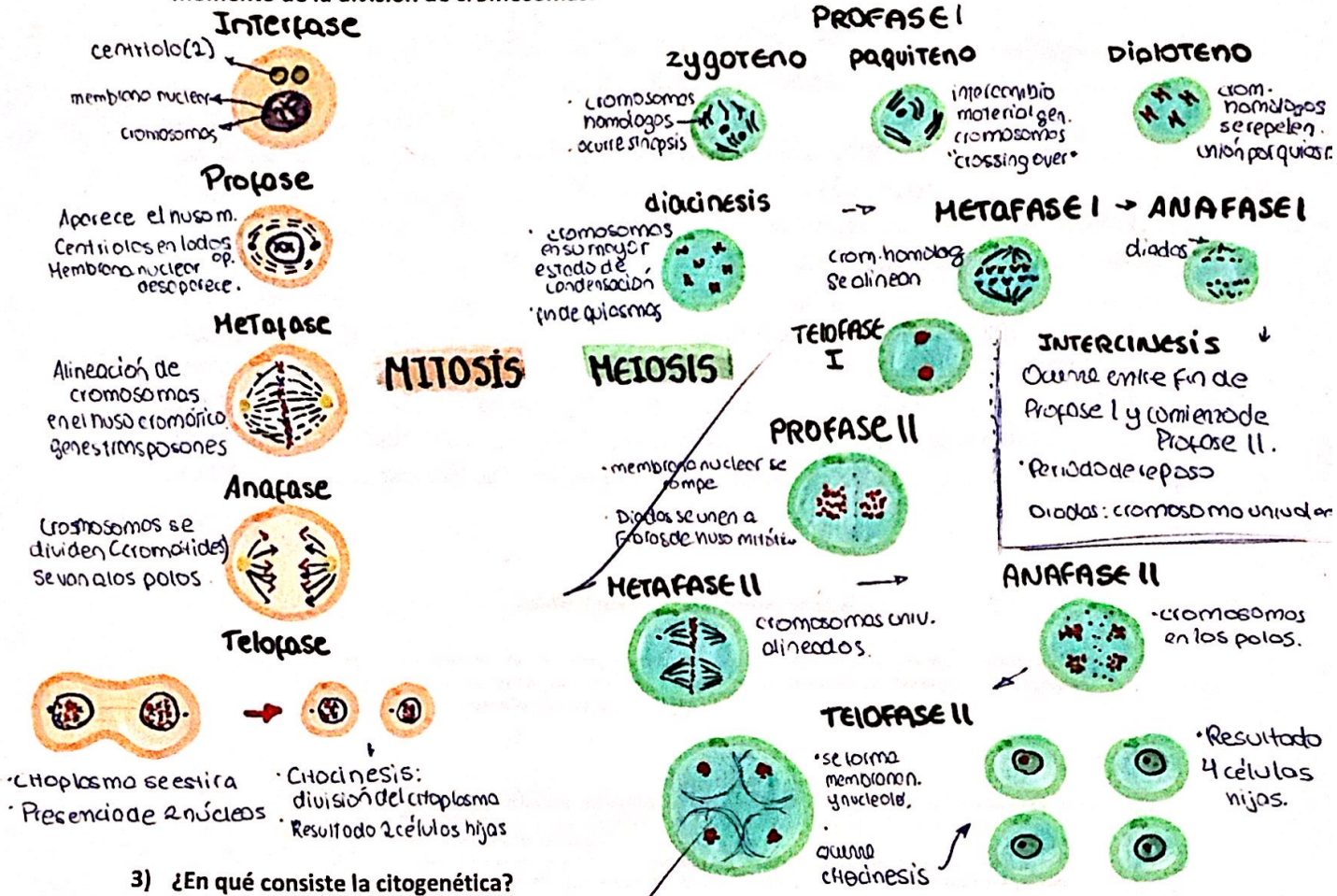


- Los cromosomas están formados por ADN enrollados muchas veces fuerte. alrededor de las proteínas que son llamados HISTONAS, las que sostienen su estructura; el Octamero está formado por dos mol. de cada uno de los histonas.
- Cada célula se enrolla, en este caso el ADN que está en multitud, la unidad fundamental de ese enrollamiento son los nucleosomas que son paquetes de pequeñas esferas llamadas histonas. luego se va formando los hebras de este ADN.

unidad de cromatina

Scanned with CamScanner

2) Grafique la mitosis y la meiosis una a lado de la otra, poner énfasis en la diferencia de ellas al momento de la división de cromosomas.



3) ¿En qué consiste la citogenética?

La citogenética es una rama de la biología que se asoció al estudio de los cromosomas, tanto en su número como en su estructura. Los cromosomas son estructuras microscópicas que contienen el ADN, material genético de las células.

4) Considera usted que los cromosomas están presentes en los organismos eucariotas y procariotas. Argumente su respuesta.

Si, los cromosomas están presentes en organismos tanto eucariotas como procariotas, pero claro, con diferencias significativas en su estructura y organización

Cromosomas en eucariotas: formados por largas moléculas de ADN enrolladas alrededor de unas proteínas llamadas histonas. El ADN se compacta en diferentes niveles de organización desde la cromatina hasta los cromosomas.

Cromosomas en procariotas: Moléculas circulares de ADN que están asociadas a proteínas no histónicas. El ADN se organiza en una estructura compacta que los eucariotas.

Scanned with CamScanner

5) Comente y explique qué aplicaciones puede tener la determinación de sexo de los gametos dentro de la veterinaria.

Es también conocido como sexaje molecular, es una técnica que permite identificar el sexo de los espermatozoides o los ovulos antes de la fecundación.
Esta técnica tiene diversas aplicaciones en el ámbito veterinario.
Reproducción animal: en la producción de ganado vacuno, porcino y ovino, la determinación del sexo de los gametos puede utilizarse para proveer crías de un solo sexo (hembra o macho) lo cual tiene ventajas económicas y de manejo.
Selección de características deseables: la determinación del sexo de los gametos puede combinarse con otras técnicas de reproducción asistida, como la fecundación in vitro o la transferencia de embriones para tener selecciones con características especiales o deseables; como la mayor producción de leche o de carne.

XI. ANEXOS

CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas humanos se describen en la mitosis y se clasifican por el tamaño, la ubicación del centrómero, las regiones, las bandas, etc. Según estos criterios se reconocen siete grupos, designados con letras mayúsculas desde la A hasta la G.

GRUPO	CARACTERISTICAS
A	Corresponde a las tres primeras parejas de homólogos. Son cromosomas grandes y de centrómeros casi medianos. Entre ellos se distinguen por el tamaño y por la ubicación del centrómero.
B	Incluye a las parejas 4 y 5. Son grandes, pero algo más pequeños que los del grupo A. Poseen centrómero submediano. Se reconocen entre sí en que la pareja 4 es algo más grande.
C	Reúne a las parejas desde la 6 hasta la 12. Son de tamaño medio y el centrómero es submediano. Este grupo presenta gran dificultad para distinguir sus cromosomas entre sí. Además hay otra dificultad, debido a que el cromosoma X es muy parecido al número 6.
D	Comprende a las parejas 13, 14 y 15. Son cromosomas de tamaño medio y acrocéntricos (centrómeros terminales). Entre ellos se distinguen por los siguientes detalles: el número 13 tiene un notorio satélite en el brazo corto y el número 14 tiene un satélite muy pequeño en su brazo corto. Por su parte, el número 15 no muestra poseer satélite.
E	Son cromosomas algo más cortos que los del grupo D. Este grupo reúne a los cromosomas 16, 17 y 18. Poseen centrómeros submediano, aún cuando el número 16 es casi mediano.
F	Corresponde a las parejas 19 y 20. Son cortos y el centrómero es aproximadamente mediano.
G	Se refiere a los cromosomas 21, 22 y 23. Son los más cortos. Además son acrocéntricos. El cromosoma 21 posee un satélite en el brazo corto.

Para la identificación de los cromosomas, la localización del centrómero es una de las referencias más útiles. Hay diferentes maneras de expresar dicha localización, pero todas se basan en la relación entre los brazos cromosómicos, los que a partir de 1971, se designan con las letras p (brazo corto) y q (brazo largo).

Una forma muy común de expresar esta localización es mediante el índice centromérico. $I = \frac{p\ 100}{p+q}$

El índice centromérico mayor es el del cromosoma 1 (48,36 ± 1,17) y el menor es el del cromosoma 13 (17,08 ± 3,28)

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°5

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DE ADN

I. OBJETIVO

- ✓ Extraer el DNA de leucocitos peritoneales murinos y leucocitos humanos
- ✓ Determinar la calidad del DNA obtenido.
- ✓ Determinar la concentración de DNA obtenido

II. INTRODUCCION

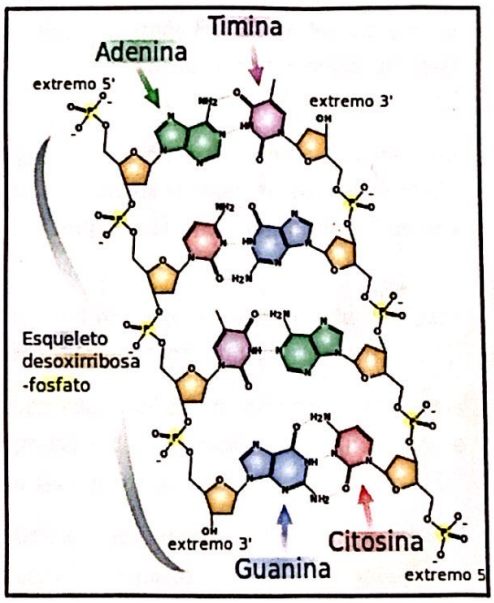
En la actualidad los avances científicos han sumado una gran cantidad de conocimiento sobre el ADN y sus aplicaciones. En el campo veterinario es una rama muy prometedora que abarca desde clasificación de animales, incluso en el ámbito urbano para mascotas y animales de granja, así como cura de enfermedades y mejoramiento genético entre muchas otras. En este informe de laboratorio mostramos conceptos básicos del ADN (Definición, composición, estructura, su extracción y otros conocimientos relacionados a esta práctica.

Como parte de su formación es indispensable conocer lo básico de esta biomolécula y su extracción para estar en competencia en su mercado profesional; siempre dentro de un ámbito ético y moral que sea para mejorar la calidad de vida de los animales y humana.

III. MARCO TEORICO

El Ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, del inglés DeoxyriboNucleic Acid, DNA. Es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las Células. Contiene la información Genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivosconocidos y de algunos Virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.

Desde el punto de vista químico, el ADN es un Polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, como si fuera un largo tren formado por vagones. En el ADN, cada vagón es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la Desoxirribosa), una Base nitrogenada (que puede ser Adenina →A, Timina →T, Citosina →C o Guanina →G) y un grupo Fosfato que actúa como enganche de cada vagón con el siguiente.



Lo que distingue a un vagón (nucleótido) de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena (el ordenamiento de los cuatro tipos de vagones a lo largo de todo el tren) es la que codifica la información genética: por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser ATGCTAGATCGC...

Scanned with CamScanner

3.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

El ADN es un largo Polímero formado por unidades repetitivas, los Nucleótidos. Una doble cadena de ADN mide de 22 a 26 Angstroms (2,2 a 2,6 Nanómetros) de ancho, y una unidad (un nucleótido) mide 3,3 Å (0,33 nm) de largo.

En los organismos vivos, el ADN no suele existir como una molécula individual, sino como una pareja de moléculas estrechamente asociadas. Las dos cadenas de ADN se enroscan sobre sí mismas formando una especie de escalera de caracol, denominada Doble hélice. La doble hélice de ADN se mantiene estable mediante la formación de puentes de hidrógeno entre las bases asociadas a cada una de las dos hebras. Los puentes de hidrógeno son uniones más débiles que los típicos enlaces químicos covalentes, como los que conectan los átomos en cada hebra de ADN, pero más fuertes que interacciones hidrófobas individuales, enlaces de Van der Waals, etc. Como los puentes de hidrógeno no son enlaces covalentes, pueden romperse y formarse de nuevo de forma relativamente sencilla. Por esta razón, las dos hebras de la doble hélice pueden separarse como una cremallera, bien por fuerza mecánica o por alta temperatura.

3.2 ESTRUCTURA

El ADN es una molécula bicatenaria, es decir, está formada por dos cadenas dispuestas de forma antiparalela y con las bases nitrogenadas enfrentadas. En su estructura tridimensional, se distinguen distintos niveles:

a) **Estructura primaria:** Secuencia de nucleótidos encadenados. Es en estas cadenas donde se encuentra la información genética, y dado que el esqueleto es el mismo para todos, la diferencia de la información radica en la distinta secuencia de bases nitrogenadas. Esta secuencia presenta un código, que determina una información u otra, según el orden de las bases.

b) **Estructura secundaria** Es una estructura en doble hélice. Explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN. Fue postulada por Watson y Crick, basándose en la difracción de rayos X que habían realizado Franklin y Wilkins, y en la equivalencia de bases de Chargaff, según la cual la suma de adeninas más guaninas es igual a la suma de timinas más citosinas. A+G = T+C

   Es una cadena doble, dextrógira o levógira, según el tipo de ADN. Ambas cadenas son complementarias, pues la adenina y la guanina de una cadena se unen, respectivamente, a la timina y la citosina de la otra. Ambas cadenas son antiparalelas, pues el extremo 3´ de una se enfrenta al extremo 5' de la homóloga.

c) **Estructura terciaria:** Se refiere a cómo se almacena el ADN en un espacio reducido, para formar los cromosomas. Varía según se trate de organismos procariotas o eucariotas:

   - En procariotas el ADN se pliega como una súper-hélice, generalmente en forma circular y asociada a una pequeña cantidad de proteínas. Lo mismo ocurre en orgánulos celulares como las mitocondrias y en los cloroplastos.
   - En eucariotas, dado que la cantidad de ADN de cada cromosoma es muy grande, el empaquetamiento ha de ser más complejo y compacto; para ello se necesita la presencia de proteínas, como las histonas y otras proteínas de naturaleza no histónica (en los espermatozoides estas proteínas son las protaminas).

Scanned with CamScanner

d) **Estructura cuaternaria:** La cromatina presente en el núcleo tiene un grosor de 300 Å, pues la fibra de cromatina de 100 Å se enrolla formando una fibra de cromatina de 300 Å. El enrollamiento de los nucleosomas recibe el nombre de solenoide. Dichos solenoides se enrollan formando la cromatina del núcleo interfásico de la célula eucariota. Cuando la célula entra en división, el ADN se compacta más, formando así los cromosomas.

e) **Estructuras en doble hélice** El ADN existe en muchas conformaciones. Sin embargo, en organismos vivos sólo se han observado las conformaciones ADN-A, ADN-B y ADN-Z. La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, la cantidad y dirección de súper enrollamiento que presenta, la presencia de modificaciones químicas en las bases y las condiciones de la solución, tales como la concentración de iones de metales y poliaminas. De las tres conformaciones, la forma "B" es la más común en las condiciones existentes en las células. Las dos dobles hélices alternativas del ADN difieren en su geometría y dimensiones.

f) **Estructuras en cuádruplex** En los extremos de los cromosomas lineales existen regiones especializadas de ADN denominadas telómeros. La función principal de estas regiones es permitir a la célula replicar los extremos cromosómicos utilizando la enzima telomerasa, puesto que las enzimas que replican el resto del ADN no pueden copiar los extremos 3' de los cromosomas. Estas terminaciones cromosómicas especializadas también protegen los extremos del ADN, y evitan que los sistemas de reparación del ADN en la célula los procesen como ADN dañado que debe ser corregido. En las células humanas, los telómeros son largas zonas de ADN de hebra sencilla que contienen algunos miles de repeticiones de una única secuencia TTAGGG.

3.3 FUNCIONES BIOLÓGICAS

Las funciones biológicas del ADN incluyen el almacenamiento de información (genes y genoma), la codificación de proteínas (transcripción y traducción) y su autoduplicación (replicación del ADN) para asegurar la transmisión de la información a las células hijas durante la división celular.

a) **Genes y genoma** El ADN se puede considerar como un almacén cuyo contenido es la información (mensaje) necesaria para construir y sostener el organismo en el que reside, la cual se transmite de generación en generación.

b) **El ADN codificante** La información de un genoma está contenida en los genes, y al conjunto de toda la información que corresponde a un organismo se le denomina su genotipo. Un gen es una unidad de herencia y es una región de ADN que influye en una característica particular de un organismo (como el color de los ojos, por ejemplo). Los genes contienen un "marco de lectura abierto" (open reading frame) que puede transcribirse, además de secuencias reguladoras, tales como promotores y enhancers, que controlan la transcripción del marco de lectura abierto.

c) **El ADN no codificante** El ADN del genoma de un organismo puede dividirse conceptualmente en dos: el que codifica las proteínas (los genes) y el que no codifica. En muchas especies, solo una pequeña fracción del genoma codifica proteínas. Por ejemplo, solo alrededor del 1,5 % del genoma humano consiste en exones que codifican proteínas (20 000 a 25 000 genes), mientras que más del 90 % consiste en ADN no codificante.

Scanned with CamScanner

El ADN no codificante (también denominado ADN basura o junk DNA) corresponde a secuencias del genoma que no generan una proteína (procedentes de transposiciones, duplicaciones, translocaciones y recombinaciones de virus, etc.), incluyendo los intrones. Hasta hace poco tiempo se pensaba que el ADN no codificante no tenía utilidad alguna, pero estudios recientes indican que eso es inexacto. Entre otras funciones, se postula que el llamado "ADN basura" regula la expresión diferencial de los genes.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

- ✓ Isopropanol frío
- ✓ Etanol 70% ayuda a suspender el ADN
- ✓ Cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) cloruro de amonio
- ✓ Buffer Lisis de eritrocitos (NH4CL 0,15, KHCO3 Y EDTA 0,1 mM) ayuda a lisar eritrocitos
- ✓ Buffer Lisis de Leucocitos (NaCl 100 mM, Tris – HCl 10 mM, Ph 8,0)
- ✓ Proteinasa K 0.1 mg/ml cloruro sodio
- ✓ Buffer TE (Tris – HCl 10 mM, EDTA 1 mM)

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas p-20, p-200, p-1000
- ✓ Microcentrifuga y centrifuga
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Tubos tapa morada con anticoagulante EDTA
- ✓ 2 jeringas de 5 ml
- ✓ Algodón
- ✓ Baño maría
- ✓ Bortex

4.3 MATERIALES BIOLÓGICOS

- ✓ Sangre humana
- ✓ Roedor

nantsen: potenciador para la expresion de un gen mediante ARN mensajero

V. PROCEDIMIENTO

A. Obtención y preparación de leucocitos

Los leucocitos peritoneales murinos se obtiene a través de un lavado de la cavidad peritoneal con solución o suero fisiológico (NaCl 0.9%).

1. Dar muerte a la rata por decapitación o asfixia con CO2.
2. Colocar la rata boca arriba.
3. Retirar la piel de la pared abdominal y proceder a limpiar dicha zona con etanol 70%.
4. Realizar un pequeño corte en la pared abdominal y con la ayuda de una jeringa (5ml) inyectar 15-20ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%) en la cavidad peritoneal.
5. Enjuagar la cavidad peritoneal realizando suaves movimientos, evitando que salga el suero inyectado.
6. Con ayuda de una jeringa de 5ml proceder a extraer lentamente el suero inyectado y colectarlo en tubos eppendorfs mantenidos en hielo.
7. Centrifugar la muestra para colectar los leucocitos peritoneales a 10000 rpm durante 20 seg.

Scanned with CamScanner

Para la obtencin de los leucocitos en sangre:

1. Colectar 5 ml de nsagre en tubos de vidrio conanticoagulante (EDTA)
2. Mezclar bien la sangre con el anticoagulante
3. Diluir la sangre 1/3 con suero fisiológico

B. Lisis de eritrocitos

1. Agregar Buffer Lisis de Eritrocitos (en una proporción 3:1) al pellet de leucocitos contaminado con sangre. En el caso de la muestra de sangre se medirá 6 ml de lisis de eritrocitos a un tubo de ensayo de 20 ml y se agrega 2 ml de sangre diluida al tubo que contiene el buffer.
2. Mezclar el tubo por inversión 5-6 veces.
3. Incubar las muestras sobre el hielo, durante 5min (mezclar el tubo 2-3 veces durante la incubación).
4. Centrifugar a 7000 rpm durante 1 min.
5. Descartar el sobrenadante (cuidando de no eliminar el pellet que contiene los leucocitos).
6. Lavar el pellet con 1 mL de suero fisiológico y volver a centrifugar como en el paso 5.

Nota: Si el pellet sigue contaminado con eritrocitos repetir la lisis.

C. Lisis de Leucocitos

1. Una vez obtenido los leucocitos agregar 500 µl del buffer Lisis de Leucocitos resuspender y traspasar a un tubo eppendorf. Mezclar la solución por pipeteo de 5 a 6 veces para realizar la lisis de los leucocitos.
2. Agregar 5 µl de proteinasa K y mezclar bien por pipeteo.
3. Incubar las muestras a 56°C durante 30 min. (agitar las muestras cada 2 min)

D. Precipitación de proteínas

1. Transcurrido el tiempo de incubación agregar a cada una de las muestras 500 µl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamilico (24:1)
2. Agitar las muestras vigorosamente durante 10 segundos
3. Centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min.
4. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf.

E. Precipitación y lavado del DNA

1. Al sobrenadante obtenido (fase acuosa), agregar un volumen de isopropanol frio.
2. Dejar precipitar el DNA durante 2h o toda la noche a -20°C.
3. Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min. El DNA formara un pellet blanco.
4. Eliminar el sobrenadante y enjuagar el pellet de DNA con 500 uL de etanol 70% frio. Invertir el tubo para resuspender el pellet.
5. Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min.
6. Eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol.
7. Resuspender el pellet de DNA en 30 uL de buffer T.E.
8. Incubar a 65°C durante 5 min. Para facilitar la resuspension.
9. Guardar el DNA a -20°C.

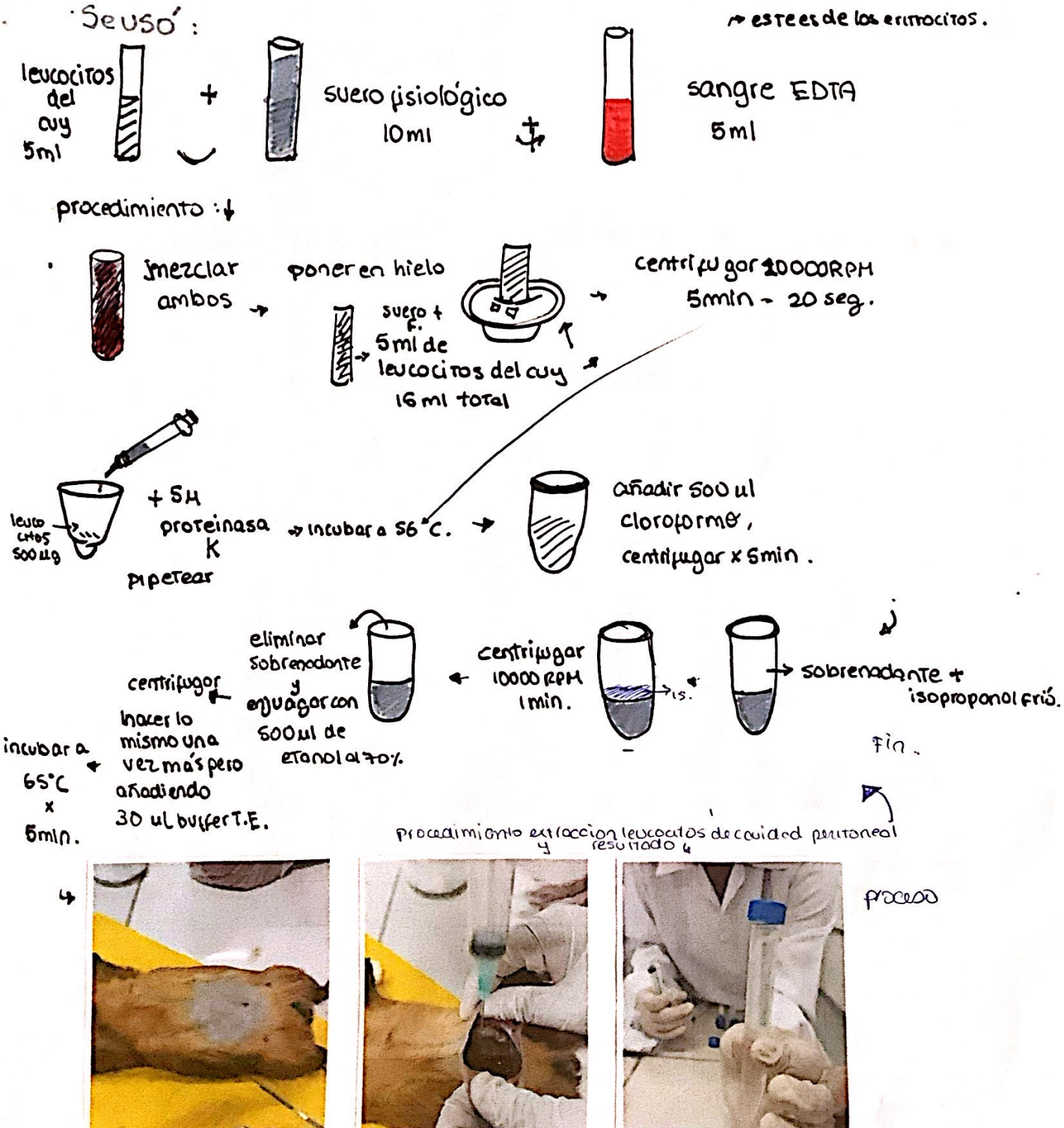
F. Determinación de la Pureza y Cantidad del DNA+

1. Hacer una dilución del DNA OBETNIDO, en agua destilada (1:10).
2. Leer las muestras de DNA en el espectrofotómetro uv-visible a 260 y 280 nm. El cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm debe ser mayor a 1.7 si el cociente es menor a esta cantidad indica que el DNA está contaminado con proteínas.
3. Para determinar la concentración de DNA hay que tener en cuenta que: Abs 1 = 50 ug/ml de DNA de doble cadena.

Scanned with CamScanner

VI. RESULTADOS

Esquematice el proceso de extracción de ADN



Procedimiento extraccion leucocitos de cavidad peritoneal y resultado

proceso

Scanned with CamScanner

Determinar la pureza y cantidad de una muestra de DNA diluida 1:10 de la muestra de ADN de la clase

- ABS: 0,247
- transmitancia = 87,7%
- moléculas que no dejan pasar las ondas de luz es 13,8%

260nm / 460nm = 50ug / x

$x = \frac{460 \times 50}{260}$

$x = 88,46$

$C = 88.46 ug/ml \times 0,247 \times \frac{1}{10}$

460nm − 480nm
260 / 1.7
460 / x.

$\rightarrow x = \frac{460 \times 1.7}{260}$ $x = 3.0$ $C = 2,18$.

Determinar la pureza y cantidad de una muestra de DNA diluida 1:10 y cuyas lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm fueron las siguientes:

Abs 260 nm = 0.055

Abs 280 nm = 0.034

Abs 260nm = 1 CORRESPONDE A 50 ug de DNA DE DOBLE CADENA

Pureza → $\frac{0,055}{0,034} = 1,62$

Cantidad de ADN: $0,055 \times Fc \times Fdi$

$0,055 \times 50 ug \times 10$

cantidad de ADN: 27.5 ug.

VII. CONCLUSIONES

Se dice que cuando el ADN no tiene transmitancia mayor a 80 hace referencia que ha sido buena muestra de ADN, porque ya que pocas luces pasaron de una onda a otra.

En la muestra que tuvimos, su absorbancia que es menor a 1 fue buena, porque si excede la muestra estaría contaminada; probablemente pudo haber fallado un paso importante en el procedimiento

Tomo en la sangre de humanos que lo del cuy se obtuvieron resultados no tan malos en el experimento.

Scanned with CamScanner

VIII. DISCUSIÓN

· Aquí se usó el espectrofotómetro para calcular la absorbancia y transmitancia de ambas muestras del animal (roedor) y sangre; en ambos se obtuvieron buenos resultados sin ninguna alteración o contaminación o mal paso en la práctica.

Se dejaron las muestras en una centrífuga, para separar primero el del cuy el ADN en el gel que se colocó; y la sangre también a 5 minutos para la separación de los leucocitos peritoneales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

· Manual de practicas y - preparación - extraccion de ADN. html. com.

· http://fernandofuyo.org/wp-content/uploads/2010/10/10/Pr%C3%practicas-geneticas%C3%-extracción C3N-ADN-Abril.2016.alumnos.pdf.

X. ACTIVIDADES

1) **Comente acerca del método Chelex de extracción de DNA a partir de sangre. Indique las diferencias son el método utilizado.**

Este método es usado especialmente cuando requerimos ADN para análisis como la PCR (reacción en cadena de polimerasa), implica el uso de la resina Chelex que permite unir iones metálicos que inhiben los enzimas usados en el PCR.

Su proceso es:
1. agregar resina Chelex a la muestra de sangre
2. hervir la solución para lisis celular
3. agitar la muestra en el vórtex.
4. centrifugar para separar el ADN del resto de los materiales.

· El ADN se encuentra en el sobrenadante.

· Este método se le considera más rapidos que otros, menos costoso y con menos pasos.

Este pulido método se usa en una variedad de muestras biológicas

Scanned with CamScanner

Se diferencia usando como un intercambio iónico y el buffer lisis usa el mismo.

Este método chelex es muy simple ya que se requiere menos pasos para hacerlo, en cambio el método buffer es un tanto más complejo por su dule son manipulaciones

2) **Indique la diferencia de acción de los buffer-LE y el buffer-LL.**

Buffer Lisis de eritrocitos	Buffer Lisis de leucocitos
• No hay núcleo • Su lisis es selectiva para simplificar la extracción de ARN. • Hace que mediante un choque hipotónico estallen los eritrocitos • Usados en aspirados de medula ósea y sangre. • Son más susceptibles su efecto en los células	Objetivo liberar ADN. Tienen compuestos que destruyen la pared celular y membrana nuclear. • Se usa en la extracción de ADN. • Solo destruye a los leucocitos dejando intactos a otras células.

3) **Mencione las diferencias entre detergentes iónicos y no iónicos. Mencione 3 ejemplos.**

Detergentes iónicos:
- Contienen cationes, aniones en su formula osea que tienen carga e⁻ neta.
- Se ionizan fácil en una solución.
- Reaccionan con los iones metales presentes en el agua.

Ejemplos: como los productos de limpieza, los usados en shampoos, detergentes líquido y en polvo.

Detergentes no iónicos:
- No tienen carga eléctrica.
- No producen iones en su solución acuosa.
- No son compatibles con aguas y otros tipos de surfactantes.

Ejemplos: polisorbatos, alcoholes grasos etoxilados.

Scanned with CamScanner

GUIA DE PRACTICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR – VETERINARIA

4) ¿Por qué es importante agregar el EDTA al buffer de Lisis de Leucocitos?

Esto es debido a que el EDTA esta en un tubo previamente ya esterilizado, por lo cual es importante usar una aguja que esté limpio osea sin ningún uso ya que podría contaminarse o alterar los resultados que queremos ver, ya que el suero sanguíneo humano o animal debe estar limpia.

- Por ello que al meter la sangre en un tubo EDTA esta no puede contaminarse, además la sustancia EDTA del tubo se adhiere a iones de ciertos metales.

5) Usted a purificado el DNA de un plásmido recombinante partir de un pequeño cultivo. El DNA lo ha resuspendido en un volumen de 50 µl. Ha diluido 20 µl de la muestra del DNA purificado en un volumen total final de 1 ml de agua destilada. A continuación a medido la absorbancia de la muestra diluida a 260 y 280 nm y ha obtenido las siguientes lecturas: A_{260}: 0.550 ; A_{280}: 0.324

a) ¿Cuál es la concentración de ADN en los 50 µl de la preparación del plásmido?

b) ¿Qué cantidad total de DNA se purifico por medio del protocolo de preparación del plásmido?

c) ¿Cuál es la relación de: A260 / A280 del DNA purificado?

1 -> $C = 50\,\mu l/ml \times 0{,}550 \times \frac{1}{20}$ | $C = 50\,\mu l/ml \times 0{,}324 \times \frac{1}{20}$

$C = 1{,}375$ | $C = 0{,}81$

2 -> $1{,}375 + 0{,}81 = 2{,}185$ => Cantidad total

3. Se dice que es un ADN de calidad porque la cantidad total es mayor que 1,7 ; si en caso fuera bajo el resultado probablemente. Sería una contaminación.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°6

ANALISIS ELECTROFORETICO DEL ADN

I. OBJETIVO

- ✓ Realizar la corrida electroforética del DNA genómico.
- ✓ Determinar el peso molecular de las muestras de DNA por comparación con un marcador de peso molecular.

II. INTRODUCCION

Después de escoger un método de extracción y purificación del ADN, se debe evaluar el procedimiento realizado para saber la calidad de ADN extraído, así como también la concentración del material genético; para esto se definirá algunos conceptos básicos:

- **Pureza de ADN:** se da cuando en la extracción no se encontraron proteínas ni otros contaminantes como lípidos, etc. por lo que solo se tienen nucleótidos suspendidos en agua. El mejor método para sacar la pureza es usando el espectrofotómetro.
- **Cuantificación de ADN:** es la concentración que tiene una solución de ADN para saber la cantidad exacta de material genético, para esto podemos usar el espectrofotómetro pero un método más exacto es la corrida de electroforesis puesto que se separan por el peso molecular.
- **Calidad de ADN:** la calidad es un indicativo sobre qué tan íntegro y completo salió el ADN y no roto por segmentos. A veces el ADN se degrada por agentes que participan en la extracción y que por error intervienen en el ADN. Este se nota en la corrida de electroforesis, si la calidad es alta saldrá una banda definida y si es baja se verá una línea desvanecida llamada efecto cometa.

III. MARCO TEORICO

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

El principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos es someter a un campo eléctrico la muestra, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos.

Scanned with CamScanner

3.1 ELECTROFORESIS CON GELES DE AGAROSA

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb.

Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción, lo que puede combinarse con otras técnicas como el Southern blot, así como para analizar los productos de una reacción de PCR.

Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante. La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular

Esta limitación de tamaños se superó con el desarrollo de una técnica denominada electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis). Esta técnica fue descrita inicialmente por Schwartz y Cantor (1984), quienes construyeron un aparato de electroforesis ortogonal en el cual dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionaban de forma alterna.

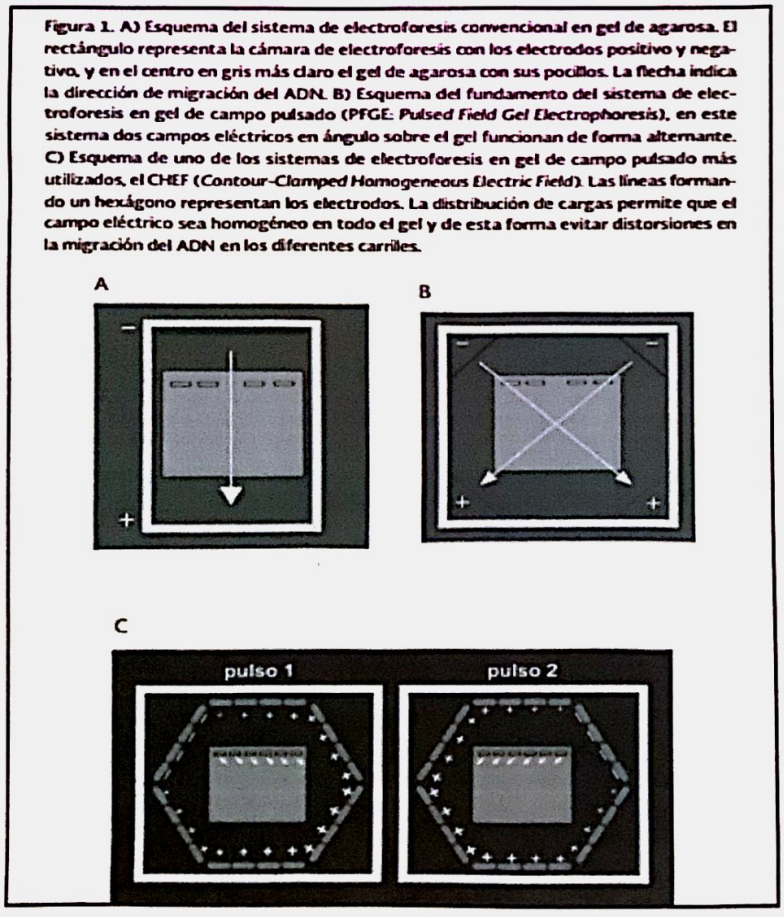


Figura 1. A) Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa. El rectángulo representa la cámara de electroforesis con los electrodos positivo y negativo, y en el centro en gris más claro el gel de agarosa con sus pocillos. La flecha indica la dirección de migración del ADN. B) Esquema del fundamento del sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), en este sistema dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionan de forma alternante. C) Esquema de uno de los sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado más utilizados, el CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*). Las líneas formando un hexágono representan los electrodos. La distribución de cargas permite que el campo eléctrico sea homogéneo en todo el gel y de esta forma evitar distorsiones en la migración del ADN en los diferentes carriles.

Scanned with CamScanner

3.2 LA AGAROSA

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos α(103) y β(104). Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de agarosa que es recomendable utilizar en función del rango de tamaño que pretendamos separar.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

- ✓ Agarosa.
- ✓ Bromuro de etidio 10 mg/ml o sybr Green
- ✓ Marcador de peso molecular para DNA

Buffer TAE 1X

- ✓ Tris-HCl 89 mM pH 8.3
- ✓ Ácido Bórico 89 mM
- ✓ EDTA 2 Mm

Loading buffer (Buffer de carga de la muestra)

- ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- ✓ Glicerol 50%
- ✓ Azul de bromofenol 0.25%
- ✓ Azul de xilencianol 0.25%
- ✓ EDTA 5 mM

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas
- ✓ Tips
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Cámara de electroforesis horizontal

V. PROCEDIMIENTO

A. Preparación del gel de agarosa

1. Pasar la agarosa de acuerdo a la concentración de gel a utilizar. Por ejemplo, para preparar un gel al 1% pesar 1g de agarosa y disolverla en 100 ml de buffer TAE.
2. Mezclar bien la agarosa con buffer TAE 1X
3. Calentar y disolver la agarosa. Se calienta la agarosa hasta que entre en ebullición y retirar inmediatamente del fuego.
4. Dejar enfriar la solución a 40°C.

Scanned with CamScanner

5. Agregar del bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml.
6. Verter la agarosa sobre el molde conteniendo los peines. El gel deberá tener entre 3-5 mm de espesor.
7. Dejar que la agarosa gelifique durante 10-15 min a temperatura ambiente.
8. Una vez que la agarosa a gelificado remover el peine con cuidado.
9. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y cubrir el gel con el buffer TAE 0.5X. El buffer deberá estar de 3-5 mm por encima del gel.

B. Preparación y cargado de la muestra

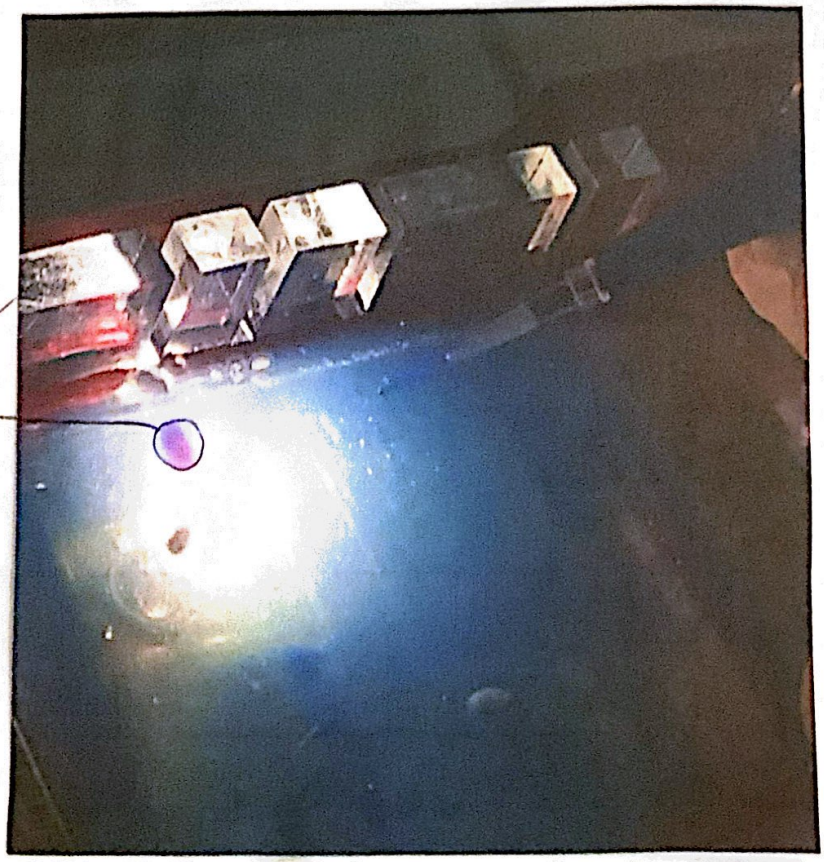
1. Mezclar las muestras de DNA con el loading buffer 6X. El loading buffer debe quedar a la concentración de 1X.
2. Cargar 20 uL de las muestras de DNA en cada una de los pozos.
3. Cargar también 4 uL del marcador de peso molecular.

C. Lisis de Leucocitos

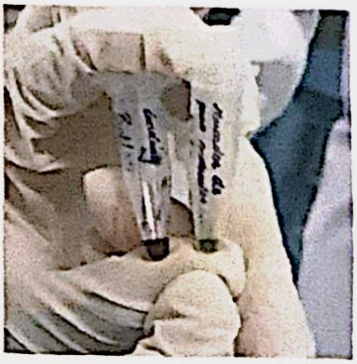
1. Conectar la fuente de poder a los electrodos de la cámara electroforética.
2. Empezar la corrida electroforética a 100 V durante 40 min.
3. Finalizada la corrida electroforética desconectar la fuente de poder.
4. Retirar el gel de la cámara de electroforesis.
5. Visualizar las bandas de DNA iluminando el gel con una lámpara de luz ultravioleta.
6. Tomar una foto al gel.

VI. RESULTADOS

Colocar una foto del gel con una leyenda de cada banda y explicando cada resultado.

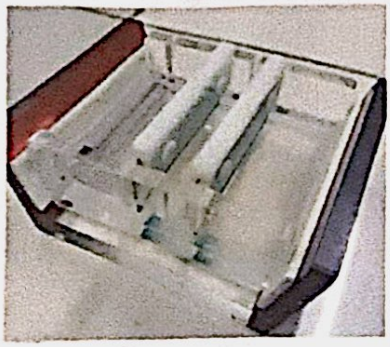


Esquematice las etapas de la práctica, y grafique (dibujo o foto) las partes más importante



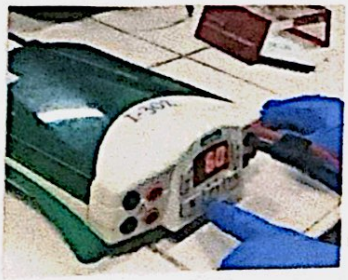
1. Se hizo la preparación previa de la agarosa de acuerdo a la concentración del gel.

2. Pesar un gramo de agarosa y disolver en 100 ml de buffer TAE.



3. Dejamos que la agarosa se gelifique con los peines por 10-15 minutos a T°ambiente.

4. Mezclar las muestras de ADN del loading buffer 6x.
Se cargó también 4 ul del marcador del peso molecular.



5. Finalmente se coloca el ánodo (+) rojo y cátodo (-) negro y las partículas de ADN migraron hacia el polo positivo

VII. CONCLUSIONES

La electroforesis de gel de agarosa permitió una separación eficaz de los fragmentos de ADN según su tamaño, facilitando la identificación de los diferentes bandas resultantes.

La técnica demostró ser precisa para la visualización de estos fragmentos de ADN, lo cual es crucial para aplicaciones en diagnóstico molecular y estudios genéticos.

El uso de un marcador de un peso molecular es fundamental para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN desconocidos proporcionando un punto de referencia esencial en el análisis.

Scanned with CamScanner

VIII. DISCUSIÓN

la electroforesis en geles de agarosa o también llamado poliacrilamido se define como una de los metodologicos que más suelen usarse en el area de laborat ; y aquí por este proceso podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función al tamaño y poder visualizarlos en una tinción, para determinar el contenido de los Ácidos nucleicos de una muestra

los ácidos nucleicos se someten a un campo eléctrico. si poseen carga negativa harán que se muevan en ánodo ; y si es positiva en sentido contrario. la electroforesis de ADN se realiza en los conocidos geles de agarosa

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Duanne quimica- Gel reperdorion bajo el contenda em of Sciences of the Unted Stdes en maduracion.

X. ACTIVIDADES

1) Indique que factores afectan la separación del DNA en una corrida electroforética.

Comunes
- Voltaje ideal.
- Tamaño del poro del gel
- Composicion del tampón
- Campo eléctrico uniforme
- Tiempo de recorrido

2) ¿Qué otros buffers se pueden utilizar en la electroforesis de DNA?

Además del TAE y TBE, existen otros tipos que se pueden usar:

- TPE -> menos común, pero sirve
- SB (Sodio Borato) → mayor resolución
- Lithium Borato (LB) → voltajes más altos.

Scanned with CamScanner

3) Determinar el peso molecular de las bandas obtenidas.

100 bp
200 bp
300 bp
400 bp
500 bp
600 bp
800 bp

→ 25 mg/ul.

4) ¿Qué criterios hay que tener en cuenta para seleccionar el voltaje y la concentración de agarosa a usar en corrida electroforética?

1. Tamaño de los fragmentos de ADN
2. Voltaje promedio
3. Duración de la corrida.
4. Integridad del gel → + más concentrado = más resistente.
5. Resolución deseada → conc. más alta de agarosa.
6. Campo eléctrico → uniforme para evitar la migración desigual del ADN.

5) Menciona 4 diferencias entre geles de agarosa y geles de policrilamida

GELES DE AGAROSA	GELES DE POLICRILAMIDA
No tóxico	Si tóxico
Separa fragmentos de ADN de 200 a 5000 pl	Separa mezclas de proteínas y fragmentos de ADN de menos de 500 pl.
Análisis de fragmentos de (polimorfismo).	Generados al mezclar, unir polímeros de Oxilamida
Son polisacáridos extraídos de planta vegetal: algas.	Alta resolución, adecuado para separar moléculas pequeños de similar tamaño
Tiene menos resolución, adecuado para separar grandes fragmentos de ADN de dif. tamaño.	

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°7

EXTRACCION Y PURIFICACION DE RNA

I. OBJETIVO

- ✓ Extraer RNA total.
- ✓ Cuantificar y determinar la pureza del RNA.

II. INTRODUCCION

El ácido ribonucleico (ARN o RNA) es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en los eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). La elección de un método de extracción de RNA depende de varios factores como son: la fuente de RNA, tipo de RNA a ser purificado, la relativa abundancia del RNA y tamaño de la muestra. El RNA es notoriamente susceptible a la degradación, por eso debe tenerse un especial cuidado durante su extracción. Todos los métodos de aislamiento de RNA usan fuertes desnaturalizantes para inhibir las RNasas endógenas durante su extracción.

En la presente practica se utilizará dos de los más potentes inhibidores de RNasas, el tiocianato de guanidina y el B-mercaptoetanol, se realizará también una extracción diferencial con solventes orgánicos (fenol acido) así como una precipitación diferencial para separar el RNA de otros tipos de ácido nucleico. Posteriormente el RNA ubicado en la fase acuosa, libre de DNA y proteínas es precipitado fácilmente con etanol o isopropanol obteniéndose de esa manera un RNA libre de contaminantes.

III. MARCO TEORICO

El ARN se puede definir como la molécula formada por una cadena simple de ribonucleótidos, cada uno de ellos formado por ribosa, un fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y uracilo). El ARN celular es lineal y monocatenario (de una sola cadena), pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra. En los organismos celulares desempeña diversas funciones. Es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica; el ADN no puede actuar solo, y se vale del ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas (producción de las proteínas que necesita la célula para sus actividades y su desarrollo). Varios tipos de ARN regulan la expresión génica, mientras que otros tienen actividad catalítica. El ARN es, pues, mucho más versátil que el ADN.

3.1 BIOQUÍMICA DEL ARN

Como el ADN, el ARN está formado por una cadena de monómeros repetitivos llamados nucleótidos. Los nucleótidos se unen uno tras otro mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente. Cada nucleótido está formado por tres componentes:

- Un monosacárido de cinco carbonos (pentosa) llamada ribosa
- Un grupo fosfato
- Una base nitrogenada, que puede ser: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y uracilo (U)

Los carbonos de la ribosa se numeran de 1' a 5' en sentido horario. La base nitrogenada se une al carbono 1'; el grupo fosfato se une al carbono 5' y al carbono 3' de la ribosa del siguiente

Scanned with CamScanner

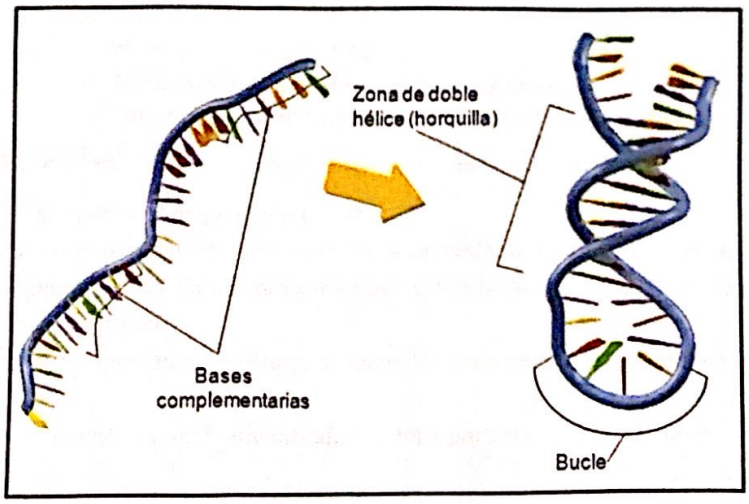
nucleótido. El pico tiene una carga negativa a pH fisiológico lo que confiere al ARN carácter polianiónico. Las bases púricas (adenina y guanina) pueden formar puentes de hidrógeno con las pirimidínicas (uracilo y citosina) según el esquema C=G y A=U. Además, son posibles otras interacciones, como el apilamiento de bases o tetrabucles con apareamientos G=A. Muchos ARN contienen además de los nucleótidos habituales, nucleótidos modificados, que se originan por transformación de los nucleótidos típicos; son característicos de los ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosómico (ARNr); también se encuentran nucleótidos metilados en el ARN mensajero eucariótico.

3.2 ESTRUCTURA

a) **Estructura primaria** Se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ARN. Los siguientes niveles estructurales (estructura secundaria, terciaria) son consecuencia de la estructura primaria. Además, la secuencia misma puede ser información funcional; ésta puede traducirse para sintetizar proteínas (en el caso del mRNA) o funcionar como región de reconocimiento, región catalítica, entre otras.

b) **Estructura secundaria** El ARN se pliega como resultado de la presencia de regiones cortas con apareamiento intramolecular de bases, es decir, pares de bases formados por secuencias complementarias más o menos distantes dentro de la misma hebra. La estructura secundaria se refiere, entonces, a las relaciones de apareamiento de bases: «El término 'estructura secundaria' denota cualquier patrón plano de contactos por apareamiento de bases.

c) **Estructura terciaria** La estructura terciaria es el resultado de las interacciones en el espacio entre los átomos que conforman la molécula. Algunas interacciones de este tipo incluyen el apilamiento de bases y los apareamientos de bases distintos a los propuestos por Watson y Crick, como el apareamiento Hoogsteen, los apareamientos triples y los zippers de ribosa.



3.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ARN.

a) **ARN MENSAJERO (ARNm)** Sus características son la siguientes:

- Cadenas de largo tamaño con estructura primaria.
- Se le llama mensajero porque transporta la información necesaria para la síntesis proteica.

Scanned with CamScanner

- Cada ARNm tiene información para sintetizar una proteina determinada.
- Su vida media es corta.

En procariontes el extremo 5´posee un grupo trifosfato. En eucariontes en el extremo 5´posee un grupo metil-guanosina unido al trifosfato, y el extremo 3´posee una cola de poli-A. En los eucariontes se puede distinguir también:

- Exones, secuencias de bases que codifican proteinas
- Introns, secuencias sin información.

Un ARNm de este tipo ha de madurar (eliminación de intrones) antes de hacerse funcional. Antes de madurar, el ARNm recibe el nombre de ARN heterogeneonuclear (ARNhn)

b) **ARN RIBOSÓMICO (ARNr)** Sus principales características son:

- Cada ARNr presenta cadena de diferente tamaño, con estructura secundaria y terciaria.
- Forma parte de las subunidades ribosómicas cuando se une con muchas proteinas.
- Están vinculados con la síntesis de proteinas.

c) **ARN NUCLEOLAR (ARNn)** Sus características principales son:

- Se sintetiza en el nucleolo.
- Posee una masa molecular de 45 S, que actua como recursor de parte del ARNr, concretamente de los ARNr 28 S (de la subunidad mayor), los ARNr 5,8 S (de la subunidad mayor) y los ARNr 18 S (de la subunidad menor)

d) **ARNu** Sus principales características son:

- Son moléculas de pequeño tamaño
- Se les denomina de esta manera por poseer mucho uracilo en su composición
- Se asocia a proteinas del núcleo y forma ribonucleoproteinas pequeño nucleares (RNPpn) que intervienen en:
  - Corte y empalme de ARN
  - Maduración en los ARNm de los eucariontes
  - Obtención de ARNr a partir de ARNn 45 S.

e) **ARN TRANSFERENTE (ARNt)** Sus principales características son.

- Son moléculas de pequeño tamaño
- Poseen en algunas zonas estructura secundaria, lo que va hacer que en las zonas donde no hay bases complementarias adquieran un aspecto de bucles, como una hoja de trebol.
- Los plegamientos se llegan a hacer tan complejos que adquieren una estructura terciaria
- Su misión es unir aminoácidos y transportarlos hasta el ARNm para sintetizar proteínas.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

- ✓ Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- ✓ Etanol 75% (DEPC)
- ✓ Nitrógeno liquido

Scanned with CamScanner

- ✓ Agua destilada DEPC
- ✓ Buffer de Lisis RNA - Tryzol

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Puntas para micropipetas

V. PROCEDIMIENTO

A. Preparación de las células o tejido

1. Tan pronto como sea obtenido el tejido, cortarlo en porciones de aprox. 3-5g. y congelarlo inmediatamente en nitrógeno líquido, luego proceder a homogenizar el tejido e un mortero evitando que el tejido se descongele agregando nitrógeno líquido al mortero cada cierto tiempo.
2. En el caso de trabajar con sangre, eliminar los eritrocitos utilizando el buffer de lisis de eritrocitos, empleando en la extracción de DNA (Practica 2).

B. Lisis y digestión de las células

1. Transferir el tejido triturado en el mortero (aprox. 50 mg) a tubos eppendorf y agregar 1000 uL del buffer de Lisis RNA (Tryzol), agitar vigorosamente para lisar el tejido durante 10 min.
2. En el caso de la sangre, una vez eliminados los eritrocitos agregar buffer de Lisis RNA (Tryzol) al pellet de leucocitos para lisar las células (1 ml de Tryzol por cada 5-10 x106 células). Todo el procedimiento de lisis debe realizarse utilizando hielo.
3. Incubar el hielo durante 5 min.

C. Extracción del RNA

1. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Tryzol. → separa prot. ARN del ADN. / Eritr.
2. Agitar vigorosamente por 15 seg.
3. Colocar las muestras en hielo por 5 min.
4. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 min. a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa (parte superior) a un nuevo tubo eppendorf. Si la interface es demasiado gruesa volver a realizar la extracción cloroformo/alcohol isoamilico.

D. Precipitación y Lavado del RNA

1. Agregar 0.5 ml de isopropanol frio por ml de Tryzol, mezclar por invension y dejar precipitar el RNA -20°C durante 10 min.
2. Recuperar el RNA por centrifugado a 12 000 rpm durante 15 min. a 4°C.
3. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de RNA con etanol (DEPC) frio al 75%. Añadir 1 ml de etanol 75% por ml de Tryzol.
4. Centrifugar a 7 500 rpm durante 5 min a 4°C.
5. Descantar el etanol y dejar secar el pellet 5-10 min. al aire libre.
6. Resuspender el RNA en 20 uL de agua destilada libre de RNasas (tratada con dietilpirocarbonato DEPC). Si se va a guardar el RNA por un largo tiempo, se recomienda guardarlo como un precipitado etanolico -20°C.

E. Determinar de la Pureza y Cantidad del RNA

1. Hacer una dilución del RNA obtenido, en agua destilada (1:10).
2. En el caso del RNA, se establece que una relación A_{260}/A_{280} con un valor de 1,8 o superior se corresponde con un RNA puro, sin ningún tipo de contaminación por parte de proteínas o de

Scanned with CamScanner

cualquier otro tipo de molécula, como los fenoles; valores menores a 1,8 se corresponderán con una muestra contaminada con proteínas. También se puede medir el ratio A_{260}/A_{230}: en este caso, a la longitud de onda de 230 nm absorben las sales caotrópicas y los hidratos de carbono, indicando pureza óptima un ratio de entre 2 y 2,2. No obstante, este ratio no se suele utilizar, ya que en el caso de que se trabaje con muestras diluidas con algún tampón, el ratio A_{260}/A_{280} no cambia, porque el contenido en proteínas es el mismo, pero sí lo hace el ratio A_{260}/A_{230} por la mayor presencia de sales, por lo que no es un excelente indicador de la pureza.

3. Para determinar la concentración de RNA hay que tener en cuenta que: Abs 260nm 1= 40 ug/ml de RNA.

VI. RESULTADOS

Determinar la pureza y cantidad de una muestra de DNA diluida 1:10 de la muestra de ADN de la clase

Se hace lo abs = 260

① 230nm

260 / 230 X 1,8 X

260 / 230 X 50ug x

② luego lo operacion

$x = \frac{230 \times 18}{260}$

$x = 1.59$

$x = \frac{230 \times 50\,ug}{260}$

$x = 44.23$

③ $C = 44.23\,ug/ml \times 0,247 \times \frac{1}{10}$

$C = 1,09$

Calcular la concentración de RNA en µg/ml con los siguientes datos:

a) A_{260}: 0.307

$C = 40\,ug/ml \times 0,307 \times \frac{1}{10}$

$C = 1,228$

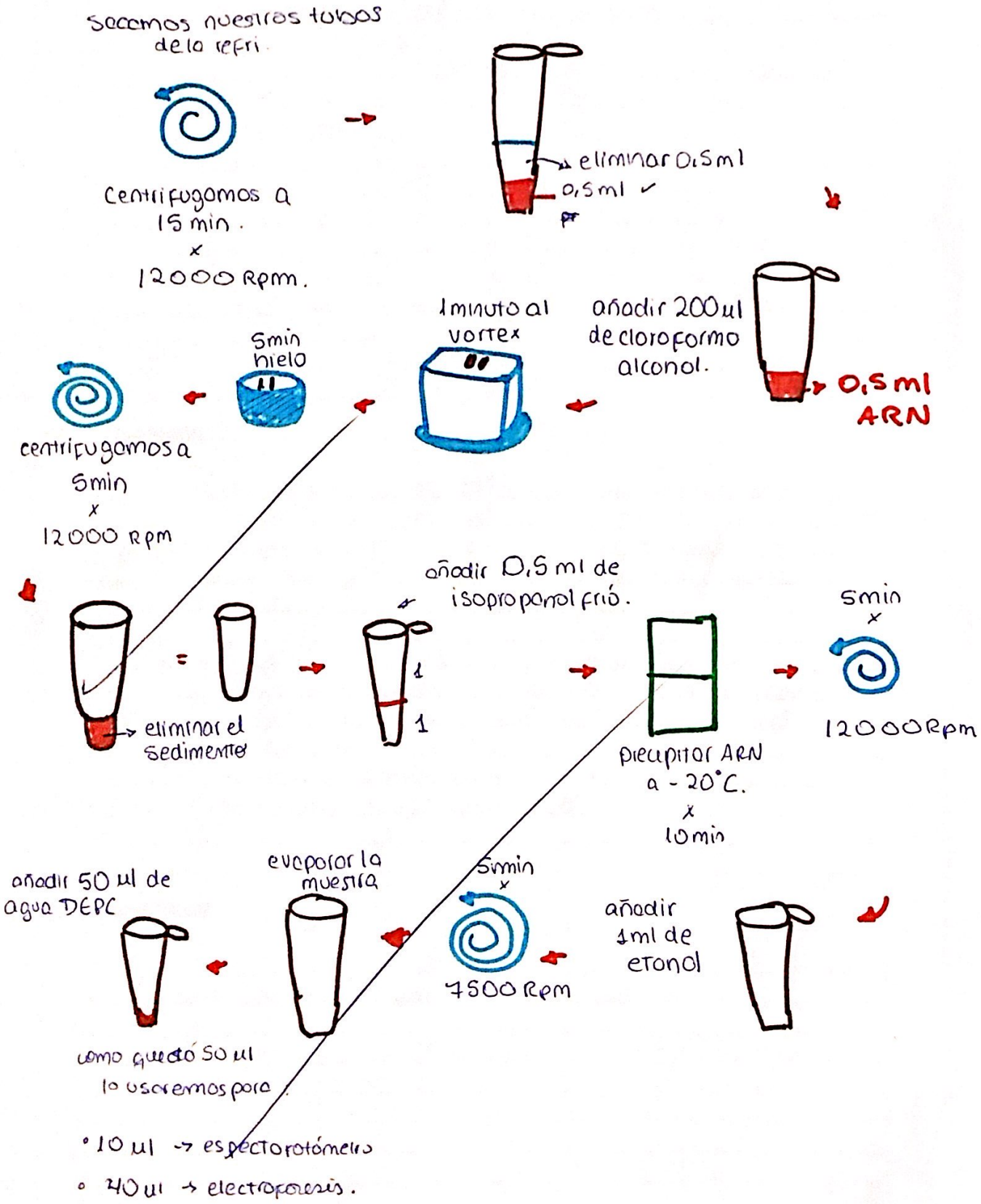
b) A_{260}: 0.172

$C = 40\,ug/ml \times 0,172 \times \frac{1}{10}$

$C = 0,688$

Scanned with CamScanner

Esquematice el proceso de extracción de ARN



Scanned with CamScanner

GUIA DE PRACTICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR – VETERINARIA

VII. CONCLUSIONES

En la practica del ARN , se usó carne y sangre humana y de perro .
El método que se realizó para extraer el ARN fue más complejo que la extracción del ADN , esto es debido a su estructura química.

El ADN se caracteriza por ser como una molécula susceptible a la degradación por enzimas , una de estos enzimas es la ARNasas El tipo de muestra y la manera en que se toma influye mucho en las características del ARN extraído

VIII. DISCUSIÓN

- Se le caracteriza al ARN por ser una molécula conformada por una cadena simple de ribonucleicos, formado cada uno por ribosa , fosforo y base nitrogenada (pueden ser adenina, guanina, citosina y uracilo).

Contiene una larga cadena que contienen los monómeros o también llamados nucleótidos , este componente se agrega uno tras otro mediante enlaces fosfodiester.
La práctica se remitió en inhibir la act. de las ARNasas en el procedimiento

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. https://genotipia.com/que-es-el-arn/
2. https://www.ampligen.es/adn-genetica/caracteristicas-arn/.

Scanned with CamScanner

X. ACTIVIDADES

1) **¿Cuáles son los 3 tipos de RNA que se encuentran en las células eucariotes, que características y funciones presentan?**

1. **ARN mensajero**: ARNm, es una molécula que transporta los mensajes escritos en el ADN a los ribosomas, donde aquí se obtienen absolutamente todas las proteínas de nuestro organismo, es capaz de llevar las instrucciones codificadas en el ADN fuera del núcleo para que los ribosomas puedan ejecutarlos.

2. **ARN ribosomal**: se localiza en los ribosomas, ayuda a leer a los ARN mensajeros y catalizar la síntesis de proteínas, es el más abundante y de mayor tamaño o peso molecular, su principal característica son: tienen cadenas de dos tamaños, estructura secundaria y terciaria.

3. **ARN de transferencia**: Tiene la función de llevar los aminoácidos a los ribosomas durante la traducción y síntesis de proteínas, es una molécula relativamente pequeña comparada con ARN mensajero.

2) **Comente sobre la ventaja del método de extracción de RNA con Tryzol en relación a otros métodos.**

La ventaja de este método es que se usa el Tryzol que es una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol que se usa para el aislamiento de ADN, ARN, proteínas, esto es una desnaturalización de proteínas.
Su ventaja es que se resume en la realización de una precipitación secuencial de ADN, ARN y proteínas a partir de una sola muestra.

3) **¿Se podría utilizar el EDTA u otro agente quelante para inhibir las RNasas? ¿Por qué?**

Si se puede usar, esto sirve para la eliminación de proteínas que se lleva a cabo mediante el uso de enzimas proteolíticas como la conocida proteinasa K, otros protocolos de extracción se realizan con lisis con detergentes catiónicos y aniónicos como los que desnaturalizan proteínas.

Con el uso de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético EDTA para inhibir la acción de las ARNasas.

Scanned with CamScanner

4) Describa la Tecnología del RNAi e indique las aplicaciones que puede tener.

El ARN produce el silenciamiento de genes de manera específica mediante el empleo de pequeñas moléculas de doble cadena de ARN. El ARN de interferencia es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos de modo que pequeñas moléculas de ARN complementarios a un ARN m conducen a la degradación de este mismo, así lograr impedir su traducción en proteínas.

Este se usa en cines médicos, terapéuticos eficaces frente a las diferentes enfermedades.

5) Mencione tres inhibidores de RNasas e indique como actúan.

1. **Tryzol:** este tipo de sustancia está compuesto por el fenol que es tóxico, la hidroxiquinoleína que es inhibidor, ARNasas hocinato de amonio, glicerol, guanidina, este permite un análisis global de la expresión génica en una variedad de muestras de humano, animal, etc.

2. **ISOTIOCIANATO de guanidina:** o GITC, es un agente fuertemente desnaturalizante, se usa usualmente en combinación con fenol-cloroformo para la extracción y aislamiento de ARN. Actúa como medio para la lisación de muestras de sangre para mantener la integridad del ac. nucleico.

3. **Complejos de Ribonucleósidos de Vanadilo o VRCs:** Son inhibidores de bajo peso molecular de los ribonucleicos se usan en la degradación selectiva del ADN mientras se aísla el ARN, son componentes tóxicos para la piel.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°8

ANALISIS ELECTROFORÉTICO DEL RNA

I. OBJETIVO

- ✓ Separar electorforeticamente el RNA
- ✓ Determinar la integridad del RNA

II. INTRODUCCION

La electroforesis es una técnica de laboratorio común utilizada para identificar, cuantificar y purificar fragmentos de ácido nucleico y evaluar la calidad. Las moléculas de ARN están cargadas negativamente, y durante la electroforesis en gel migran hacia el ánodo en presencia de una corriente eléctrica.

La longitud del ARN generalmente determina su migración en el gel, ya que las moléculas de ARN más largas se mueven más lentamente que los fragmentos más cortos. Sin embargo, las moléculas de ARN están sujetas a una estructura secundaria extensa a través del emparejamiento de bases intramoleculares, y esto puede afectar su migración de gel. Para la mayoría de las aplicaciones, el ARN se ejecuta usando condiciones de desnaturalización para interrumpir la estructura secundaria. Para aplicaciones tales como la resolución de diferentes conformaciones de ARN, se recomiendan geles nativos (o no desnaturalizantes).

III. MARCO TEORICO

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

El principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos es someter a un campo eléctrico la muestra, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

3.1 ELECTROFORESIS CON GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación.

Scanned with CamScanner

Así como en el caso de la agarosa, determinar la concentración apropiada para las moléculas que se van a evaluar por medio de un gel de poliacrilamida resulta crucial. El tamaño de los poros de estos geles está determinada por la concentración final de acrilamida y biscacrilamida, de los cuales usualmente hay una proporción 19:1 para la observación de DNA o RNA desnaturalizado y una proporción de 29:1 para la mayoría de las proteínas y geles nativos para DNA y RNA. Si se regula adecuadamente la relación y concentración de acrilamida con poliacrilamida se podrán obtener diferentes porosidades, que serán menores que la de geles de agarosa.

3.2 LA POLIACRILAMIDA

El gel de poliacrilamida era ya conocido como un medio potencial para la inclusión de tejidos seccionados en 1959. Se trata de un gel sintético, termoestable, transparente, resistente, relativamente inerte, químicamente hablando, que puede prepararse con un amplio intervalo de tamaños medios de poro. El tamaño de poro de un gel está determinado por dos factores: la concentración total de acrilamida presente (%T) (T = concentración total de monómeros de acrilamida y bisacrilamida) y la cantidad del reticulador(%C) (C = concentración del reticulador). Los tamaños de poro disminuyen cuando aumenta %T, y con reticulación el 5%C produce el menor tamaño de poro. Cualquier incremento o disminución en %C aumenta el tamaño de poro (función parabólica). Esto parece deberse a la estructura no homogénea de los filamentos del gel.

El gel formado a partir de este material también puede resistir gradientes de alto voltaje, ser viable para varios procedimientos de tinción y destinción y puede ser digerido para extraer fracciones separadas o desecado para su autorradiografía y registro permanente. La electroforesis en disco utiliza geles de distintos tamaños de poro. El nombre de electroforesis en disco deriva del acrónimo inglés DISC, que hace referencia a las discontinuidades en la matriz electroforética y por coincidencia a la forma discoidal de las zonas separadas de iones. Hay dos capas de gel, el gel de apilamiento o espaciador y el gel de resolución o separador.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

Buffer TE, pH =7,6

- ✓ Tris - HCl 10 mM
- ✓ EDTA 1 mM

Buffer TAE 1X

- ✓ Tris-HCl 89 mM pH 8.3
- ✓ Ácido Acetico 89 mM
- ✓ EDTA 2 mM

Loading buffer (Buffer de carga de la muestra)

- ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- ✓ Glicerol 50%
- ✓ Azul de bromofenol 0.25%
- ✓ Azul de xilencianol 0.25%
- ✓ EDTA 5 mM

Scanned with CamScanner

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Cámara de electroforesis horizontal
- ✓ Lámpara de luz ultravioleta
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Fuente de Poder

V. PROCEDIMIENTO

A. Preparación del gel de agarosa

1. Pasar la agarosa de acuerdo a la concentración de gel a utilizar. Por ejemplo, para preparar un gel al 1% pesar 1g de agarosa y disolverla en 100 ml de buffer TAE 1X. En la presente practica se preparará un gel de 1.8%.
2. Traspasar la agarosa pesada a un matraz de 50 ml.
3. Agregar la cantidad apropiada de buffer TAE 1X.
4. Mezclar bien la agarosa con buffer TAE 1X
5. Calentar y disolver la agarosa. Se calienta la agarosa hasta que entre en ebullición y retirar inmediatamente del fuego.
6. Dejar enfriar la solución a 40°C.
7. Agregar del bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml.
8. Verter la agarosa sobre el molde conteniendo los peines. El gel deberá tener entre 3-5 mm de espesor.
9. Dejar que la agarosa gelifique durante 15-20 min a temperatura ambiente.
10. Una vez que la agarosa a gelificado remover el peine con cuidado.
11. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y cubrir el gel con el buffer TAE 0.5X. El buffer deberá estar de 3-5 mm por encima del gel.

B. Preparación y cargado de la muestra

1. Mezclar las muestras de RNA con el loading buffer 6X. El loading buffer debe quedar a la concentración de 1X.
2. Calentar las muestras a 50°C durante 5min.
3. Con una micropipeta de 0-20 uL cargar las muestras de RNA en cada uno de los pozos. Se recomienda cargar 5-10 ug de RNA por pozo.
4. Cargar también 5 uL del marcador de peso molecular.

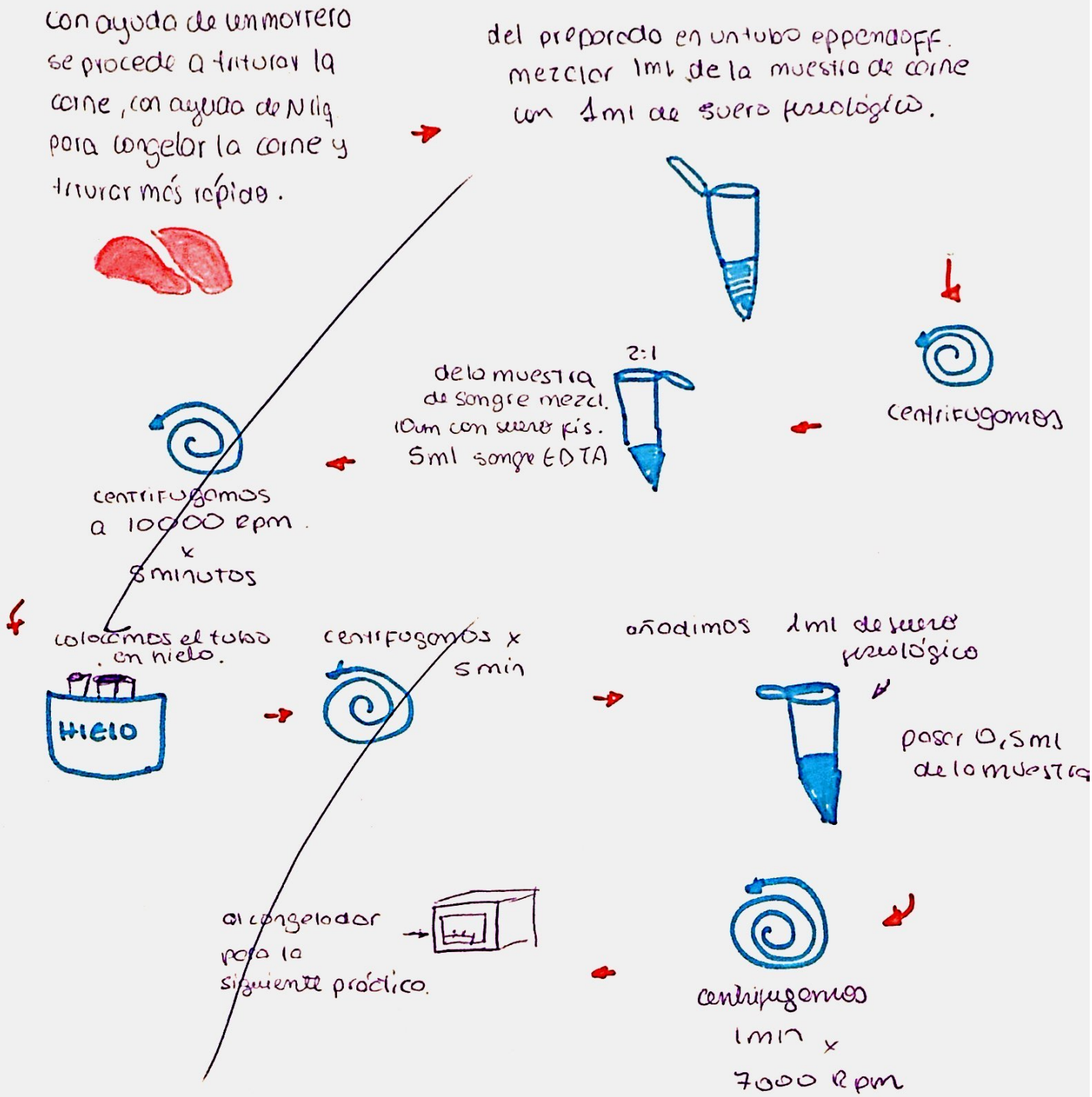
C. Corrida electroforética y visualización de las bandas

1. Conectar la fuente de poder a los electrodos de la cámara electroforética.
2. Empezar la corrida electroforética a 100 V durante 50 min.
3. Finalizada la corrida electroforética desconectar la fuente de poder.
4. Retirar el gel de la cámara de electroforesis.
5. Visualizar las bandas de RNA iluminando el gel con una lámpara de luz ultravioleta.
6. Tomar una foto al gel.

Scanned with CamScanner

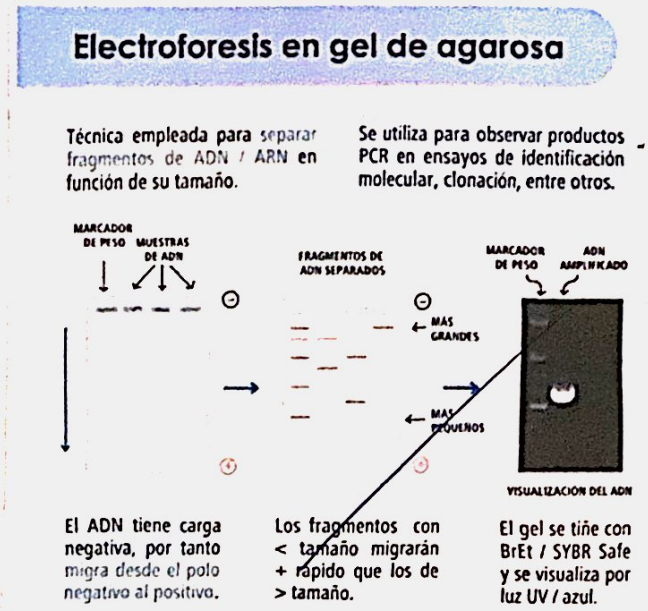
VI. RESULTADOS

Esquematice los pasos para la electroforesis del RNA.



Scanned with CamScanner

Colocar una foto del gel con una leyenda de cada banda y explicando cada resultado.



VII. CONCLUSIONES

Se concluye que la electroforesis es una técnica de laboratorio usada para identificar cuantificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos y evaluar la calidad.

El gel de poliacrilamida es usado en relación con el trabajo de ácidos nucleicos y resolución de altos voltajes.

VIII. DISCUSIÓN

La electroforesis posee un poder de resolución mucho mayor, lo que permite la separación de moléculas que se difiere en una sola base.

Scanned with CamScanner

GUIA DE PRACTICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR – VETERINARIA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- https://www.um.es/molecula/nuc103.htm.
- Ausubel FM Brent R Kingston RE Moore D.D Seidman G Smith JA Struhl (1999) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.

X. ACTIVIDADES

1) ¿Qué otros buffers se pueden utilizar en la electroforesis de RNA? Indique su composición y en que situaciones se les puede usar.

1. TBE (Tris - Acetato - EDTA)

- Composición: Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM. EDTA 1mM, pH 8.0

- Este buffer es de menor capacidad de amortiguación que el TBE ; permite una mejor recuperación del RNA del gel. Se usa para electroforesis de corta plazo

2. TBE (Tris - Borato - EDTA)

- Composición: Tris 89nM, ácido bórico 89nM, EDTA 2 mM, pH 8.0

- Es un buffer con alto capacidad de amortiguación que el TAE, ; adecuado para electroforesis a largo plazo de RNA. Brinda una buena resolución de los fragmentos de RNA.

2) ¿Cuál es la finalidad de agregar formaldehido al gel y al loading buffer de RNA?

Su finalidad es desnaturalizar el ARN, evitar la formación de estructuras secundarias.

- Formaldehido → ayuda a mantener el ARN desnaturalizado durante la separación electroforética.

- Loading buffer → ambos en conjunto hacen que sea más resistente.

Scanned with CamScanner

3) Mencione 3 diferencias entre la electroforesis del RNA y de DNA

ADN	ARN
Se usan geles de agarosa con concentración 0-7 % - 1%	Moléculas de ARN son más pequeños.
Muestras con loadding buffer son directamente	Se usan geles de agarosa con menor concentración de 1 - 1,5 % de formaldehido
depositados en el gel sin calentar previamente.	Con eso permite una mejor separación de los bandas de RNA de menor tamaño

4) ¿Qué criterios hay que tener en cuenta para determinar la integridad del RNA?

1. La pureza no debe estar contaminada por sustancias como carbohidratos, proteínas, etc.
2. La inhibición de ARNasas es importante durante el procedimiento para evitar rupturas.

5) Por qué se utiliza las bandas de 28s y 8s de RNA ribosomal como marcadores de la integridad de una muestra de RNA total. ¿Para bacterias se utilizará los mimos marcadores? ¿Por qué?

1. Las bandas de 28S y 8S es donde se encuentran la mayoría de genes codificantes, como el genoma humano, este contiene un aproximado de 200 copias de genes de ARN ribosomal, 28S, 18S, 5S, 8S.

- Cuando hablamos de bacterias eucariotas estos presentan 70S, y los grandes se dividen en 23S, 8S y pequeños 16S que es donde se encuentran los bases.

- El ARN, 28S, 5, 8S, 18S estos localizan e identifican en regiones de los cromosomas a eucariotas, y de agar formando procariotas de 23S, 5S, 16S.

No se usan los mismos marcadores.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°9

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

I. OBJETIVO

- ✓ Extraer proteinas total.
- ✓ Cuantificar y determinar la pureza del RNA.

II. INTRODUCCION

En este trabajo práctico se obtendrán los extractos proteicos crudos de distintos órganos de ratón. Se realizará una centrifugación diferencial y la precipitación salina con distintas concentraciones de sulfato de amonio de la fracción soluble. Finalmente se cuantificarán las fracciones del extracto proteico, que serán el material de partida en el TP Nº3 (electroforesis en gel de poliacrilamida).

III. MARCO TEORICO

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula, ellas constituyen más del 50% del peso seco de la célula. Cada tipo celular, tiene un rol específico determinado por su composición proteica. Con la posibilidad de que 20 (o 22) aminoácidos diferentes puedan estar unidos en cualquier orden para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos, tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación.

Una bacteria puede tener cerca de 1000 proteínas diferentes, en una célula humana puede haber más de 10.000 clases de proteínas distintas. La composición proteica de las células en un determinado momento depende del conjunto de genes que se estén activando y esto está relacionado directamente con las señales que recibe la célula, de su micro ambiente y de las características celulares que le son propias. Es decir que el patrón proteico de una célula vegetal será distinto al de una célula animal, una célula hepática de un ratón, será distinta de una célula hepática de un humano, y a su vez una célula hepática de ratón será distinta a una neurona del mismo animal

La expresión de proteínas puede estudiarse por ejemplo, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Para esto es necesario extraer primero las proteínas a partir de las células que constituyen los tejidos u órganos. Al momento de elegir el protocolo a seguir para obtener el extracto crudo, es importante tener en cuenta tanto el material de partida como su posterior utilización:

- Material biológico de partida-tipo de organismo: En el caso de órganos u otros tejidos animales, es necesario disgregarlos antes de proceder a la lisis celular, ya que las células se encuentran rodeadas de tejido conectivo. En general estas técnicas involucran la utilización de enzimas (como por ejemplo colagenasa) y/o una ruptura mecánica grosera. Para esto pueden utilizarse morteros, homogeneizadores eléctricos, tijeras o tamices metálicos (mesh), entre otros.
- Cuando el material es un cultivo celular, la extracción puede realizarse adicionando un detergente, realizando un shock osmótico, o por sonicación.
- Finalidad del extracto proteico: esto determinará el buffer de extracción que se utilizará dependiendo se desea o no que las proteínas conserven su actividad biológica, su conformación nativa, su interacción con otras proteínas u otras moléculas.

Scanned with CamScanner

La extracción de proteínas celulares comienza siempre con una ruptura celular o lisis. Los métodos más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos.

Se han desarrollado una amplia gama de técnicas de disrupción celular, que se usan a escala de laboratorio que se pueden clasificar como:

a. **Métodos físicos mecánicos:** agitación con abrasivos, homogeneización a alta presión o extrusión por presión;
b. **Métodos físicos no mecánicos:** shock osmótico, ciclos de congelación descongelación, sonicación o secado;
c. **Métodos químicos:** tratamiento con álcali, solventes, detergentes, ácidos o sustancias caotrópicas

En general, el extracto obtenido es sometido a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones basados en algunas propiedades tales como tamaño o carga, proceso denominado fraccionamiento. Las primeras fases en este proceso suelen utilizar diferencias en la solubilidad de las proteínas.

Existen diversos factores que afectan esta solubilidad; en particular, la composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); la estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína.

La mayoría de las proteínas absorben a 280 nm, y a bajas concentraciones, lo hacen de manera proporcional con su concentración. Este es un método rápido y sencillo pero tiene la desventaja es que la muestra debe estar pura, ya que otras moléculas no-proteicas como el DNA, también absorben a esa longitud de onda. Por otro lado, los ensayos colorimétricos involucran la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante una medida de absorbancia. En general, estos métodos son más sensibles que la cuantificación por absorbancia directa a 280 nm.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

Buffer de Lisis

- ✓ Tris-Cl 50 mM (pH 8.0)(buffer)
- ✓ NaCl 150 mM
- ✓ SDS 0,1 %
- ✓ Nonidet p40 (NP40) 1 %(detergente)
- ✓ Fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) 100 ug./ml(inhibidor de proteasas.).
- ✓ Aprotinina 1 ug./ml.(inhibidor de proteasa.).

Reactivo de Bradford

- ✓ Azul Brillante de Comassie G(colorante)
- ✓ Etanol 95 %(disolvente)
- ✓ Ácido Ortofosfórico 85 %(agente redox) q.p

Scanned with CamScanner

Buffer Sample (Laemli) 2x

- ✓ Tris-Cl 62,5 mM (pH 6.8)(buffer)
- ✓ Glicerol 10 %(dar densidad a la muestra para que esten en los pozos del gel)
- ✓ SDS 2 %(detergente)
- ✓ B-mercaptoetanol 5 %(romper uniones disulfuro)
- ✓ Azul de bromofenol 0,2 %(colorante)

4.2 MATERIALES

- ✓ Mortero
- ✓ Hielo
- ✓ Eppendorf
- ✓ Espectrofotómetro

V. PROCEDIMIENTO

A. PARA TEJIDOS

1. Una vez obtenido el tejido (aprox. 100 – 200 mg), se introduce inmediatamente en nitrógeno líquido, para congelarlo y así detener las acción de proteasas que degradarían las proteínas, con la ayuda de un embolo se tritura el tejido que contiene 1 ml de buffer de lisis
2. Todo el procedimiento de trituración se realiza sobre hielo (0°C) y por un tiempo no mayor de 2 – 3 min., con la finalidad de evitar la degradación de las proteínas por las proteasas.
3. Luego el extracto obtenido se transfiere a un Eppendorf y se lleva a centrifugación por 15-20 min. a 13 500 rpm. A 4°C o por 10 minutos a 13,500 rpm en una centrífuga no refrigerada.
4. El sobrenadante obtenido (donde están las proteínas) se mezcla, una parte con el reactivo de Bradford, para cuantificar proteínas; y otra parte con el Buffer sample para realizar la electroforesis.

B. PARA CELULAS

1. Se agrega el buffer de lisis directamente a las células en una proporción 1:1
2. Luego con la ayuda de un embolo ,se mezcla con el buffer de lisis , todo este procedimiento se lleva a cabo sobre hielo ,por un tiempo no mayor a 2-3 minutos .y luego el extracto obtenido se transfiere a un eppendorf y se procede como anteriormente se ha indicado para el caso de tejidos.

C. CUANTIFICACION DE PROTEINAS(BRADFORD)

1. En un Eppendorf se coloca 950 ul de Agua destilada, 10 ul. de la muestra (tomado del sobrenadante, luego de la centrifugación) y 50 ul. del reactivo de Bradford .
2. Para preparar el blanco se coloca 950 ul de Agua destilada, 10 ul. De NaCl 0,15 M, y 50 ul. del reactivo de Bradford.
3. Luego de mezclar los tubos, se lleva a leer las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

D. CÁLCULOS: Valores de absorbancia de la muestra menos el valor de la absorbancia del blanco multiplicada por el factor de calibración. Obteniéndose la concentración de proteínas en microgramos por mililitro.

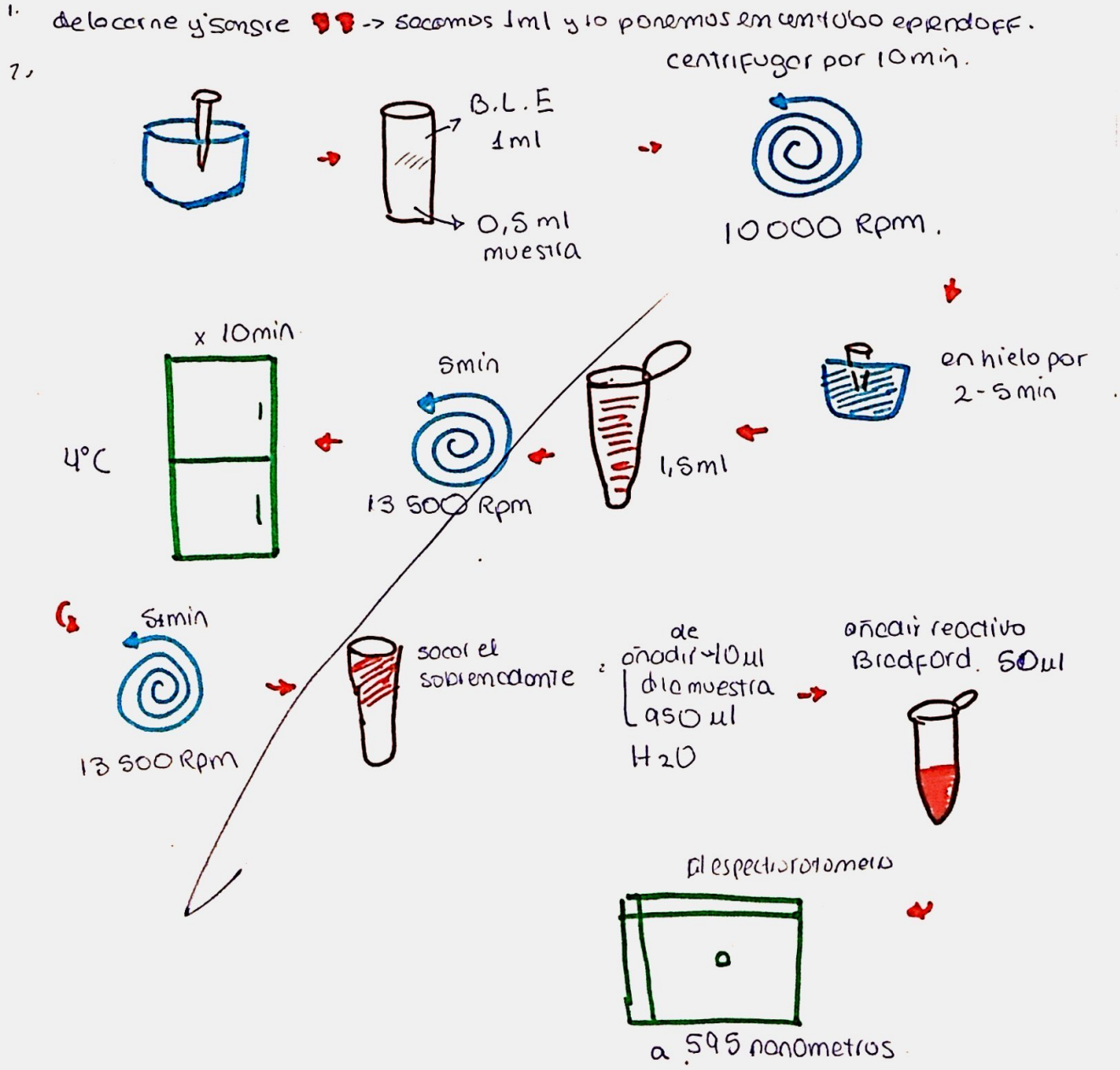
Scanned with CamScanner

E. MEZCLA DEL BUFFER SAMPLE CON LA MUESTRA.

1. Se toma 200 ul. Del sobrenadante (muestra) y se mezcla con 200 ul. De Buffer Sample 2x. Se puede tomar una mayor o menor cantidad del sobrenadante, de acuerdo al volumen de muestra que se desee obtener, pero la mezcla con el Buffer sample debe ser siempre en una proporción 1:1
2. Luego se introduce las muestras en agua hirviendo por 3 min.
3. Finalmente se centrifuga a 13 500 rpm., durante 5 min., quedando así la muestra lista para realizar la corrida electroforética.

VI. RESULTADOS

Esquematizar el procedimiento de la extracción de proteínas.



Scanned with CamScanner

GUIA DE PRACTICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR – VETERINARIA

VII. CONCLUSIONES

Lo práctica de la extracción de proteínas con fenol fue eficaz y nos permitió la recuperación eficiente de proteínas, actuó eliminando los componentes no proteicos, como los lípidos, polisacáridos, etc.

Se usó para esta practica el gel de poliacrilamida para la electroforesis.

VIII. DISCUSIÓN

Las proteínas son moléculas muy presentes en los seres vivos, pero no todas son iguales en los organismos, cada unidades posee proteínas específicas.
Contienen más del 50% del peso seco de la célula.

Entonces su expresión se realiza en mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, por ejemplo si extraemos de algún órgano es importante hacer la disgregación antes de hacer la lisis, esto se hace usando enzimas.
Puede hacerse de diferentes manera la extracción:

- Métodos físicos
- Métodos químicos
- Métodos físicos no mecánicos

IX. BIBLIOGRAFÍA

https://www.uv.es/tunon/pdf-doc/proteinas-09.pdf.

https://www.ppb.csic.es/servicios/proteomica/extraccionacuten-de-proteinas/.html.

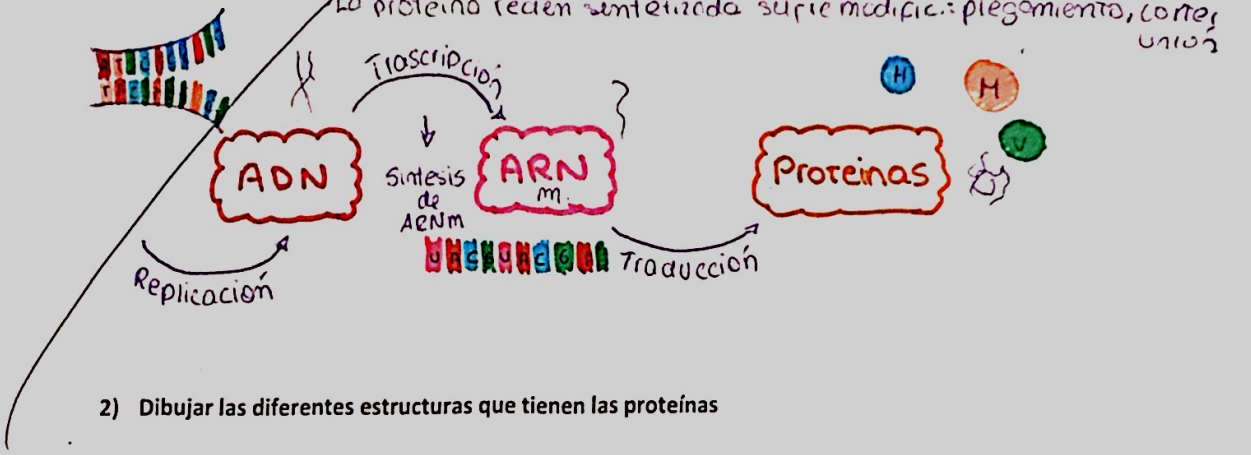
X. ACTIVIDADES

1) Explicar y graficar cómo se sintetiza las proteínas a partir del ADN

llamada expresión génica. -> proteínas son macromoléculas formadas por varios AA.

Etapas principales

1. Se hace la replicación del ADN para poder ser transcrito.
2. **Transcripción** : La información genética (ADN) es transcrita en una mol. de ARN mensajero por la enzima ARN polimerasa
3. **Traducción** : ARNm sale del núcleo → citoplasma → ribosomas, aquí el ARNm es leído por mols. de ARNt que llevan un AA específ. La proteína recién sintetizada sufre modific.: plegamiento, corte, unión



2) Dibujar las diferentes estructuras que tienen las proteínas

Estructura primaria
unión peptídica
secuencia de AA.

Estructura secundaria.
enlaces o puentes de hidrógeno.

Estructura terciaria de proteínas.

Estructura cuaternaria de las proteínas.
+ de 1 cadena de AA.

Scanned with CamScanner

3) Escribir las funciones de las proteínas

Tienen funciones:

1. **Función estructural**: formando parte de la estructura de las células, tejidos, dando soporte y rigidez como: colágeno, et
2. **F. Enzimática**: catalizan reacciones químicas en el metab celular, como las pepsinas, ATP sintasa, ADN polimerasa.
3. **F. Reguladora**: controlan procesos celulares, como las hormonas (insulina, glucagon)
4. **F. contráctil**: permite movimiento de células, como la actina, miosina

También cumple función transportadora de moléculas, protección, almacenamiento, señalización, etc.

4) Que son las proteinasas y como se puede inhibirlas

Las proteinasas actúan rompiendo enlaces peptídicos entre los AA de las proteínas

Otras proteinasas participan en procesos biológicos como las proteasas digestivas que descomponen proteínas, renovación celular, procesamiento de proteínas..

Tiene inhibidores específicos, como los inhibidores serinas-proteasas al cual se unen.

Es crucial para mantener el equilibrio proteolítico en las células y prevenir su degradación descontrolada

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°10

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

I. OBJETIVO

- ✓ Separar una mezcla de proteínas utilizando electroforesis en geles de poliacrilimida.

II. INTRODUCCION

En la presente practica también llegaremos a cuantificar proteínas totales extraídas de una muestra vegetal (hoja de geranio) y de levaduras transgénicas pro el método de Bradford. Este método está basado en los diferentes cambios de color en respuesta a diferentes concentraciones de proteína y es recomendable pro las siguientes razones: 1) es mucho más fácil de usar, requiere de un solo reactivo y demora 5 minutos; 2) el complejo reaccionante es relativamente estable y 3) no es afectado por otros compuestos.

El método Bradford para proteínas está basado en la observación del máximo de absorbancia para una solución acida de Azul Brillante de Comassie a una longitud de onda de 465 a 600 nm cuando ocurre la unión a la proteína, contrastado con una curva de calibración de absorbancia con albummina.

III. MARCO TEORICO

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS (´SDS-polycrilamide gel electrophoresis´). Trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptidicas aisladas.

En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforensis de la muestra en el primer gel (´stacking´). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl-de los tampones de carga en el gel de apilamiento (´stacking´).

Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato solo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl- si hay una región de ´field strenght´. ´Field strenght´es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración, El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que [Cl-] > [proteína-SDS] > [glicinato]. Como solo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl- y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su

Scanned with CamScanner

movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl- deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazaran a su propia velocidad.

SDS es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptidicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional solo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa, Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

La determinación de la concentración de proteínas en una solución es un procedimiento analítico crítico que debe ser acompañado rápida y adecuadamente por alta sensibilidad y bajo costo. Se ha desarrollado una variedad de procedimientos para cuantificar proteínas en especímenes biológicos, y estas metodologías han sido mejoradas desarrollando nuevos experimentos.

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

Running Gel

- ✓ Acrilamida 29.2% (forma cadenas lineales y actua como soporte del gel)
- ✓ Bisacrilamida 0.8% (forma puentes cruzados, y actuan como sopore del gel)
- ✓ Tris.Cl 1.5 M pH = 8.8 (buffer)
- ✓ SDS 10% (detergente)
- ✓ Amonio persulfato (APS) 10% (donador de iones)
- ✓ TEMED (actúa sobre el APS y este libera iones para la polimerización de acriy bisacrilamida)

Stacking Gel

- ✓ Acrilamida 29.2%
- ✓ Bisacrilamida 0.8%
- ✓ Tris,Cl 0.5 M pH =6.8
- ✓ SDS 10%
- ✓ Amonio persulfato (APS) 10%
- ✓ TEMED

Running Buffer pH = 8.3

- ✓ Tris – HCL
- ✓ Glicina
- ✓ SDS

Tinción de Geles con Plata

- ✓ Etanol 30%
- ✓ Ácido acético 10%, 1%
- ✓ AgNO3 0.1%
- ✓ Carbonato de Sodio 2.5%
- ✓ Formaldehido 0.02%

Scanned with CamScanner

Tinción de Geles con Azul Brillante de Comassie

- ✓ Azul Brillante de Comassie R-250 0.25%
- ✓ Metanol de 50% y 10%
- ✓ Ácido acético 10 y 5%

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas
- ✓ Tips
- ✓ Micro centrífuga
- ✓ Tubos eppedorl
- ✓ Cámara de electroforesis vertical

V. PROCEDIMIENTO

A. Preparación del Gel

1. Para preparar el Running y Stacking gel se mezclan cada uno de sus componentes en el orden indicado en las siguientes tablas:

Running Gel	7.5%	10%	12.5%	15%
Acrilamida – Bis (29.2:.8%)	2.5 ml	3.3 ml	4.13 ml	5.0 ml
H2O desionizada	4.4 ml	3.6 ml	2.77 ml	1.90 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	50 (5µl)	10 (5µl)	10 (5µl)	10 (5µl)

Stacking Gel	Volumen
Acrilamida – Bis	430 µl
H2O desionizada	1.88 ml
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	830 µl
SDS 10%	33 µl
APS 10%	16 µl
TEMED	3.3 µl

Nota: Al agregar el TEMED comenzara la polimerización.

Scanned with CamScanner

2. Luego de haber armado las placas de vidrio en su soporte, se procede a agregar el TEMED al running gel (con lo cual comienza la polimerización) se mezcla bien y se lo vierte entre las plazas de vidrio dejando un espacio suficiente para el Stacking Gel. Con la ayuda de una micropipeta se cubre con agua la parte superior del running gel, para que el oxígeno no difunda hacia el gel ya que este inhibe la polimerización.
3. Después de que se completa la polimerización (10 – 15 min.) se elimina el agua de la parte superior del gel y se lava algunas veces con agua destilada para remover alguna Acrilamida no polimerizada.
4. Ahora puede agregar el TEMED al Stacking Gel y verterlo directamente sobre la superficie del running gel polimerizado. Insertar inmediatamente el peine dentro la solución del Stacking gel, teniendo mucho cuidado de no formar burbujas de aire.
5. Después de que se completa la polimerización se retira el peine cuidadosamente y se lavan los pozos inmediatamente con agua destilada para remover alguna Acrilamida no polimerizada.
6. Luego se monta el gel en el aparato de electroforesis (electrodo) y se le coloca dentro de la cubeta a la cual se agrega running buffer hasta cubrir el gel.

B. Cargado de la Muestra

1. Con una micropipeta se coloca una misma concentración de proteína para todas las muestras, dentro de los trozos de gel.
2. Para calcular la concentración de proteínas se utiliza los datos obtenidos al cuantificar proteínas con el reactivo de Bradford.
3. Se recomienda la menor concentración posible de proteínas (10.5.3 ug) con la finalidad de obtener una buena separación de las proteínas.
4. Se conecta el aparato de electroforesis a la fuente de poder y se realiza la corrida a 150 v. durante 1h.
5. Una vez terminada la corrida se separa las placas de vidrio del aparato de electroforesis y se procede a sacar el gel separando ambas placas.
6. Se marca la orientación del gel cortando la esquina apartir de la cual se empezó a cargar las muestras.
7. Ahora el gel se puede ser fijado para teñirlo con Azul de Comassie o Plata o usarlo para un Western Blot.

C. Tinción de Geles

Azul de Comassie

1. Colocar el gel en la solución de tinción (metanol 50%, ácido acético 10%, azul de comassie 0.25%) permitiendo que el gel se tiña con agitación suave, durante al menos 30 min., pero no más de 3 h.
2. Retirar la solución de tinción y guardarla porque puede ser usada varias veces, y agregar la solución de desteñido (metanol 10%; ácido acético 5%) cambiando esta solución cuando ya esté muy azul hasta que las bandas se observen claras y con un fondo claro.

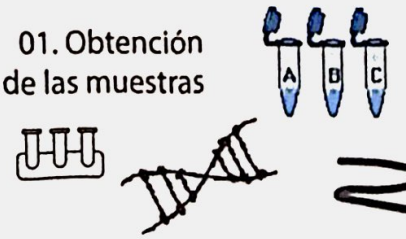
Nitrato de Plata

1. Después de correr un gel colocar 5 volúmenes de etanol al 30%, ácido acético al 10% por 3h., o toda la noche con agitación.
2. Remover la solución de etanol / ácido acético y adicionar 5 volúmenes de etanol 30%.

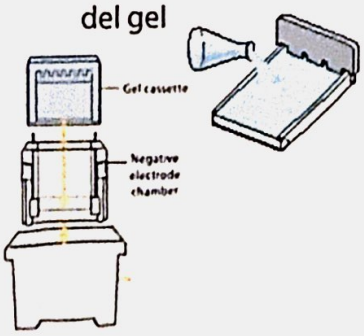
Scanned with CamScanner

Electroforesis

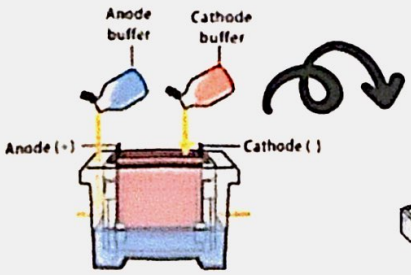
01. Obtención de las muestras



02. Preparación del gel

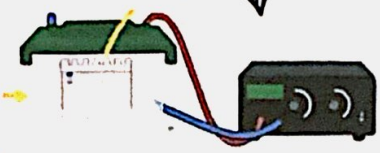


03. Preparación de las muestras con el buffer de carga

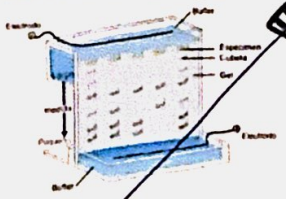


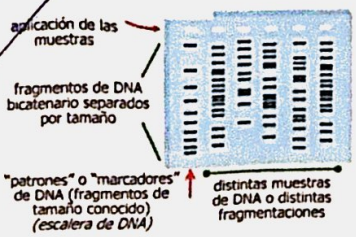
04. Carga de las muestras

05. Corrida del gel

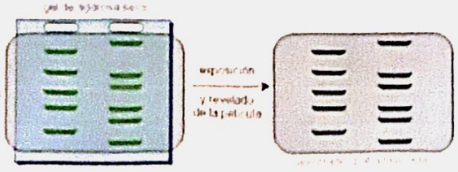


06. Tinción del gel

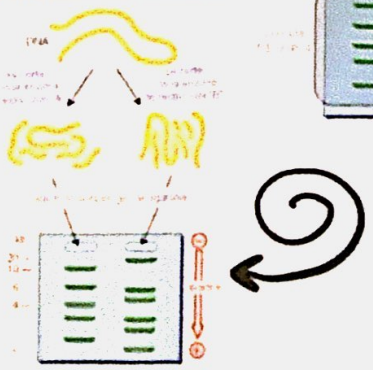




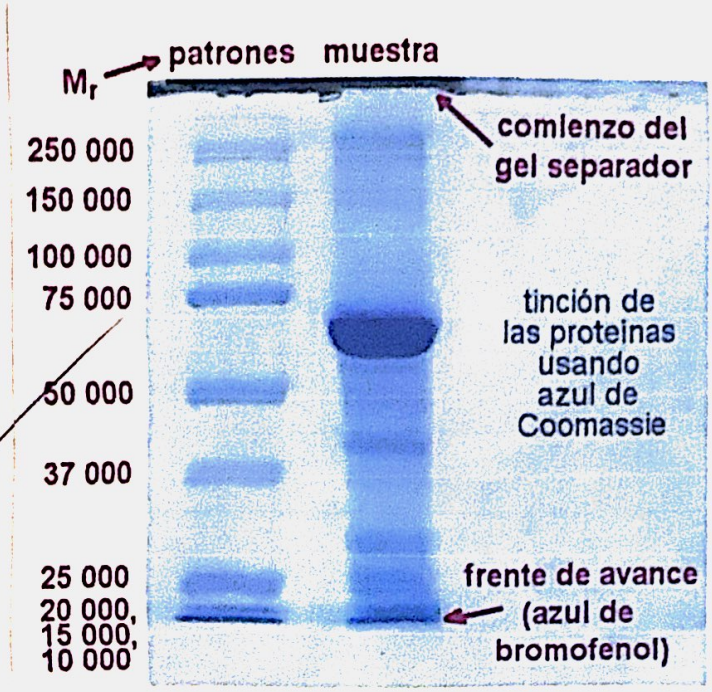
07. Visualización del gel con luz UV



08. Análisis de resultados



Colocar una foto del gel con una leyenda de cada banda y explicando cada resultado.



VII. CONCLUSIONES

la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se usa para separar y analizar proteínas, todo en forma de bandas según su tipo de peso molecular. La separación tiene lugar en el gel separador.

Haber separado el gel nos permite separar una mezcla de proteínas en forma de bandas según su peso molecular en la electroforesis.

VIII. DISCUSIÓN

La electroforesis es una técnica de laboratorio que permite la separación de proteínas de acuerdo a sus características físicas y el método usado.

Scanned with CamScanner

La SDS-PAGE en la electroforesis de proteínas es la más usada, se caracteriza por ser un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

https://www.tuasaude.com/es/electroforesis-de-proteinas/.com.

https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis#;~;text.=La%20electroforesis%20es%20una%20técnica,gel%20o%20de%20otra%20matriz.

X. ACTIVIDADES

1) ¿Cuál es el fundamento de la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDSD-PAGE)?

Es una técnica de laboratorio usada para la separación y analizar las proteínas en función de su tamaño y carga.

Las moléculas cargadas como las proteínas migran en un campo e⁻, la velocidad de migración depende de la carga neta, las moléculas más pequeñas, con + carga migran más rápido.

El SDS (dodecilsulfato de sodio): es un detergente aniónico que se une a las proteínas de forma desnaturalizante, desplegando y rompiendo sus enlaces no covalentes.

2) ¿Qué diferencias existe entre una electroforesis continua y una discontinua?

Electroforesis continua: se usa un gel único de concentración unif. la muestra se aplica en un punto específico del gel. las moléculas se separan en función de su movilidad electroforética. Se usa para la separación de pequeñas moléculas (iones, etc).

Electroforesis discontinua: se usan dos tipos de gel: gel de apilamiento y gel de separación (mayor concentración) se aplica en forma de banda, las muestras se separan en función de su tamaño, se usa para la separación de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos).

mejor resolución

Scanned with CamScanner

La electroforesis discontinua suele ofrecer una mejor resolución que la electroforesis continua para la separación de macromoléculas.

La electroforesis discontinua permite concentrar las muestras antes de la separación, útil para muestras con baja concentración.

La electroforesis continua es más sencilla y rápida que la discontinua.

3) ¿Cuál es el fundamento de la acción del TEMED?

TEMED en Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Temed: Tetrametiletilendiamino es un compuesto orgánico que participa en la PAGE, usado para separar y analizar proteínas por su tamaño y carga.

El TEMED actúa como iniciador en la reacción de polimerización de la acrilamida, es el componente principal del gel de PAGE.

Su presencia tiene varios efectos como la ayuda de aumentar la velocidad de polimerización, regula el tamaño del poro en gel y mejora la estabilidad del gel, evitando que se dañe o rompa el gel durante la electroforesis.

4) ¿Cuál es la función del SDS en la electroforesis de proteínas?

El SDS es un componente importante en la PAGE, este componente desnaturaliza a las proteínas y unifica su carga.

Se conoce como un detergente aniónico, rompe los enlaces covalentes y convierte a las cadenas en unas cadenas polipeptídicas lineales.

En resumen su función principal es la desnaturalización de proteínas, unificación, separación precisa en función a su tamaño molecular.

Scanned with CamScanner

PRÁCTICA N°11

LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

I. OBJETIVO

- ✓ Amplificar un segmento determinado de DNA por PCR.
- ✓ Verificar la amplificación del DNA a través de una electroforesis en geles de agarosa.

II. INTRODUCCION

La biología molecular se basa en técnicas que posibilitan la obtención de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos. El uso de radioisótopos más recientemente alternativas no radiactivas proporcionan métodos para identificar y rastrear ácidos nucleicos. La clonación de ácidos nucleicos en vectores con un elevado número de copias, permite la amplificación de secuencias de DNA en células vivas proporcionando una fuente casi ilimitada de estas moléculas de DNA para posterior manipulación. Con introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) niveles más sensibles de detección y niveles Superiores de amplificación de secuencias específicas de DNA son llevadas a cabo en menos tiempo en comparación a los métodos mencionados anteriormente.

III. MARCO TEORICO

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica relativamente simple por la cual un molde de DNA es amplificado muchos cientos y millones de veces rápida y confiablemente, generando suficiente material para el subsecuente análisis experimental. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método in vitro para sintetizar y amplificar enzimáticamente secuencias definidas de DNA.

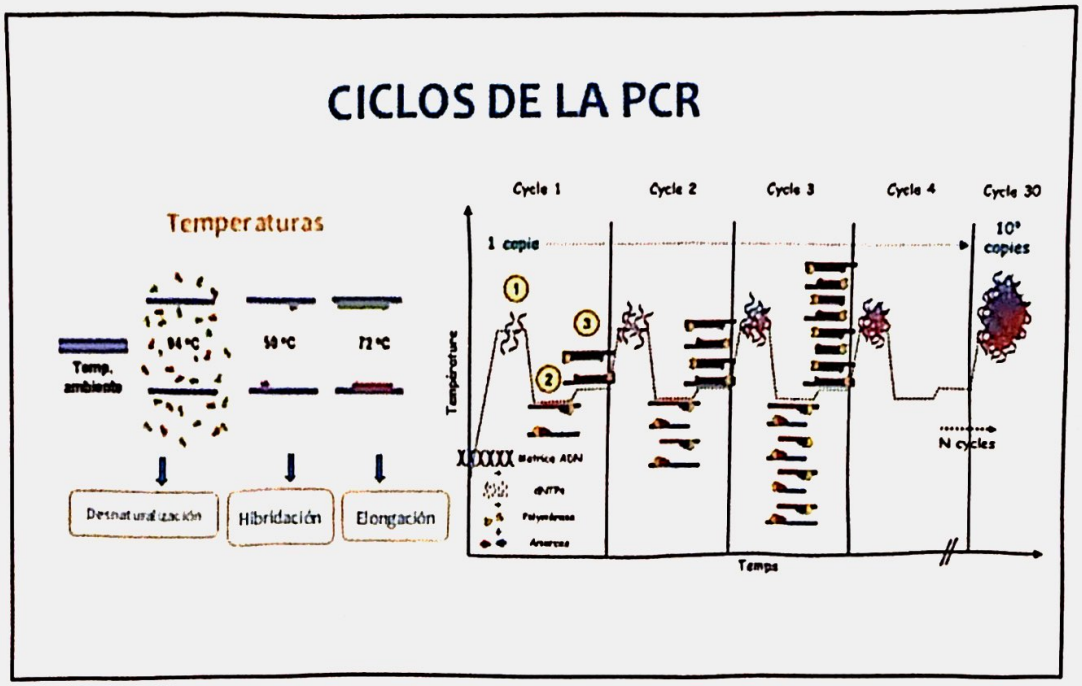
Una reacción típica de amplificación incluye a la muestra de DNA molde, una DNA polimerasa termoestable, dos primers oligonucleotidos, desoxinucleotidos trifosfatados (dNTPs), buffer de reacción y magnesio. Los componentes de la reacción son mezclados y la reacción se lleva a cabo en un termociclador el cual es un instrumento automatizado que lleva a cabo la reacción a través de una serie de diferentes temperaturas con variaciones de tiempo.

El Paso inicial en un ciclo desnaturaliza el DNA por calentamiento a 95°C o más durante 15 seg. a 2 min. En el proceso de la desnaturalización de dos cadenas de DNA se desarrollan y se separan una de otra produciendo el molde necesario de DNA de cadena simple para la polimerasa termoestable.

En el siguiente paso el ciclo se reduce la temperatura a aproximadamente 40-60°C. A esta temperatura los primers oligonucleotidos pueden formar asociaciones estables (alineación) con las cadenas de DNA molde separadas y sirven como primers para la síntesis de DNA por una polimerasa termoestable. Este pasó dura aproximadamente 30-60 seg.

Finalmente, la síntesis de una nueva cadena de DNA comienza cuando la temperatura de reacción se incrementa a la óptima para la polimerasa termoestable. Para muchas polimerasas termoestables esta temperatura es aproximadamente 74°C. La extensión de primers por la polimerasa termoestable requiere aproximadamente de 1-2 min. Este paso completo un ciclo y el siguiente ciclo comienza con el retorno a 95°C para la desnaturalización.

Scanned with CamScanner



Los productos de una primera ronda de amplificación son moléculas de DNA de tamaño heterogéneo cuya longitud puede exceder la distancia entre los sitios de unión de los dos primers. En la segunda ronda de amplificación estas moléculas generan DNAs con una longitud definida por los primers, las que se acumulan en una forma exponencial en las siguientes rondas de amplificación y llegarán a ser los productos dominantes de la reacción. Cada ciclo de PCR teóricamente duplica la cantidad de la secuencia molde de DNA en la reacción. Diez ciclos teóricamente amplifican la secuencia por un factor de cien, veinte ciclos por más de un factor de más de un millón en cuestión de horas. Pues de 20-40 ciclos, el ácido nucleico amplificado puede ser analizado por tamaño, cantidad y secuencia y usado en otros procedimientos de biología molecular.

3.1 Hot Start

En PCR convencional la Taq- Polimerasa se activa a temperatura ambiente y en menor grado, aun sobre hielo. Cuando todos los componentes de la reacción son mezclados puede ocurrir una unión no específica de los primers a estas temperaturas. Este Unión no específica de los primers puede ser extendida por la Taq polimerasa, generando productos no específicos y disminuyendo la cantidad de producto. El Hot Start reduce significativamente esta interacción no específica de los primers, la formación de dimeros de primers y a menudo incrementa la cantidad de producto. Clásicos métodos implican la adición manual de determinados componentes e incrementan el riesgo de contaminación. En el Hot Start se utiliza un anticuerpo qué neutraliza e inactiva completamente a la Taq polimerasa. La actividad polimerasa es completamente restaurada durante el primer paso de desnaturalización de un ciclo de PCR.

Scanned with CamScanner

IV. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 REACTIVOS

Platinum supermix

- ✓ Primers (50 pmolul)
- ✓ DNA molde (50 ng/ug)
- ✓ Agarosa
- ✓ Bromuro de etidio 10 mg/ml

Buffer TBE 1X

- ✓ Tris-HCl 89 mM pH 8.3
- ✓ Ácido Bórico 89 mM
- ✓ EDTA 2 mM

Loading buffer

- ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- ✓ Glicerol 50%
- ✓ Azul de bromofenol 0.25%
- ✓ Azul de xilencianol 0.25%
- ✓ EDTA 5 mM

4.2 MATERIALES

- ✓ Micropipetas
- ✓ Tips
- ✓ Tubos eppendorf (200 ul)
- ✓ Termociclador

V. PROCEDIMIENTO

A. .Preparación de la reacción de amplificación

1. Reparar la mezcla de reacción para PCR como indica a continuación:
   - o Platimun super mix 25ul
   - o Primers (F,R) 1.5ul (por cada primer)
   - o DNA molde 2 ul
   - o Agua desionizada 20 ul
2. La mezcla de los componentes de la reacción de PCR debe realizarse en tubos eppendorfs de 200 ul y a bajas temperaturas (0 - -4°C).
3. Realizar la programación de termociclador, después de un paso inicial de desnaturalización de 95°C (Hot Start) durante 1 min. programar las siguientes temperaturas para 20 ciclos:
   - o Paso de desnaturalización 94°C
   - o Paso de alineación 58°C
   - o Paso de extensión 72°C
4. Una vez terminados los ciclos de amplificación incubar a 72°C durante 5 min.
5. Enfriar las muestras a -4°C.
6. Analizar los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.
7. Para la optimización y validación de la reacción de PCR se recomienda incluir controles positivos y negativos.

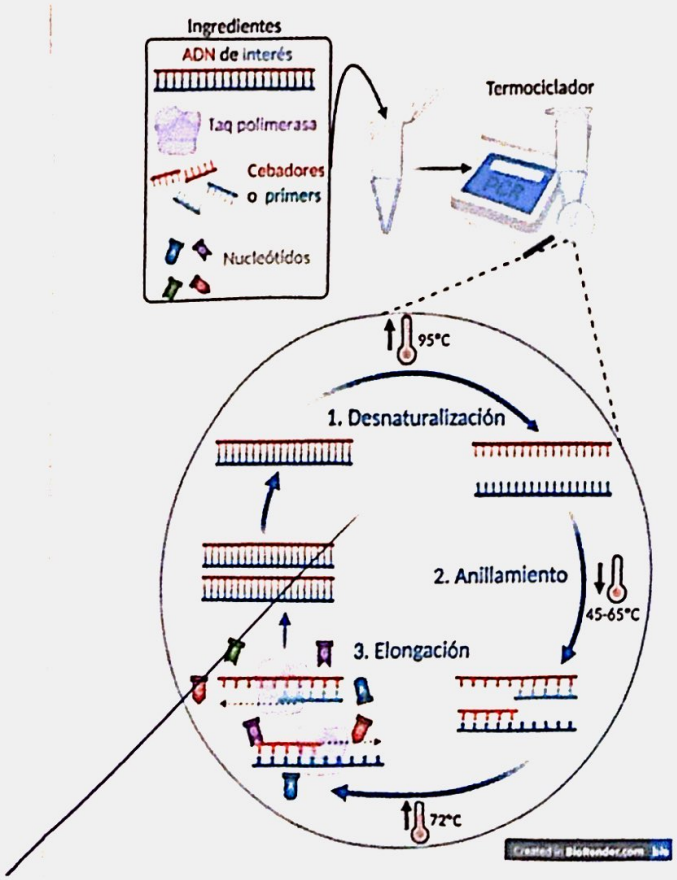
Scanned with CamScanner

B. Análisis de los productos de PCR.

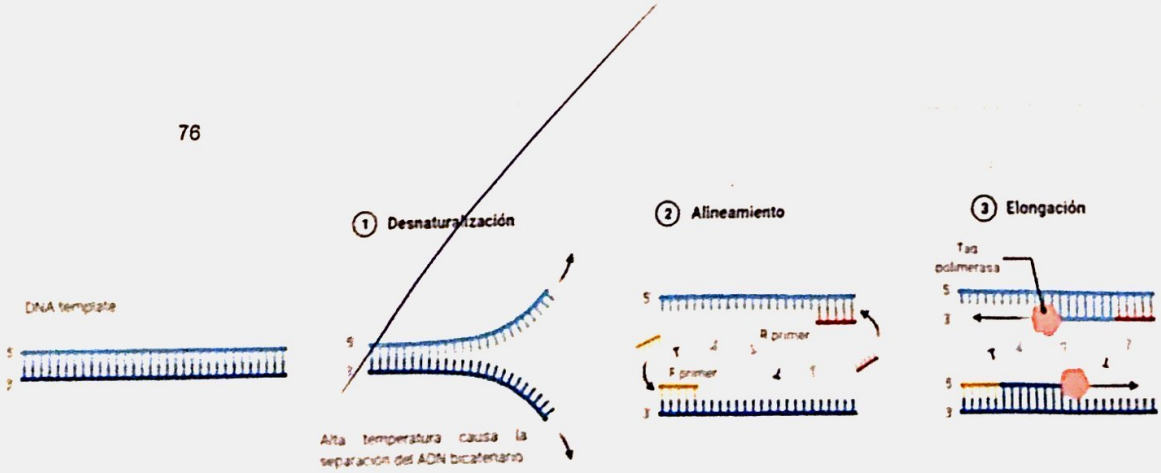
1. Analizar 10-15 ul de cada producto de PCR a través de una electroforesis en geles de agarosa al 2%.
2. Las muestras de PCR pueden ser guardadas al menos una semana a -4°C y al menos un mes -20°C.

VI. RESULTADOS

Esquematizar el procedimiento del PCR



76



Scanned with CamScanner

VII. CONCLUSIONES

El PCR se inicio con la desnaturalización de la muestra y separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento para asi obtener una ruptura de puentes de hidrógeno

Es una técnica útil, permite la producción de millones de moléculas de ADN.

VIII. DISCUSIÓN

La reacción de la cadena de la polimerasa es una de las técnicas más revolucionarios esta técnica permite amplificar (crear copias) de un segmento especifico de ADN a partir de una cantidad mínima de material

La PCR se basa en la replicación del ADN mediante la acción de una enzima llamada ADN polimerasa, amplifica cantidades mínimas de ADN, es rapido pero limitado

IX. BIBLIOGRAFÍA

https://centromedicoabc.com/procedimientos/pruebas/de/ADN/-pcr/.

Scanned with CamScanner

X. ACTIVIDADES

1) **¿Cuáles son los principales pasos que implica la reacción en cadena de la polimerasa y en que consiste cada uno?**

1. Desnaturalización
2. Anillamiento
3. Extensión
4. Desnaturalización y anillamiento

- El objetivo de la desnaturalización es lograr separar los 2 hebras de la doble hélice del ADN molde, a una T° de 95°C, obteniendo 2 hebras de ADN monocatenarios.

- En el anillamiento se unen los primers a regiones específicas del ADN molde, luego se empezará, esto para iniciar el sitio de síntesis del nuevo ADN.

- En la extensión se sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a cada hebra molde, usando los primers, luego se mezclara y calentará, sintetizando una nueva hebra de ADN compl

2) **Mencione 3 aplicaciones de la PCR y explique cada una.**

1. Para el diagnóstico de enfermedades
- La PCR permite detectar la presencia del ADN bacteriano en muestras de pacientes (sangre, orina, heyda), también se usa para presenciar ARN viral en muestras de LCR, saliva, sangre, heces.

2. Para la investigación.
- La PCR permite analizar la cantidad de ARNm transcrito a partir de un gen específico, usado también para amplificar y clonar genes de interés para ser estudiados, analiza pequeñas cantidades de ADN de restos biológicos.

3. Biotecnología.
Se usa para amplificar genes que codifican proteínas de interes, los cuales se pueden expresar en células huésped para su producción a gran escala, introducir o modificar genes.

3) **Explique porque es importante el procedimiento de Hot Start.**

Esta es una técnica usada para mejorar la especificidad y rendimiento de la reacción en cadena de pol.

Scanned with CamScanner

Se basa en la inhibición temporal de la actividad de la polimerasa de ADN a temperaturas bajas, evitando la amplificación no específica de productos no deseados.

4) ¿Cuáles son los principales factores que afectan la reacción en cadena de la polimerasa?

1. Calidad del ADN molde, este es esencial para obtener resultados confiables en PCR.
2. Diseño de primers (cebador), estos son oligonucleótidos cortos que delimitan el segmento de ADN a amplificar.
3. Concentración de primers.
4. Elección de la polimerasa de ADN
5. Contaminación.

5) ¿Qué es la PCR cuantitativa?

También conocido como PCR en tiempo real (qPCR) permite cuantificar la cantidad inicial de un fragmento de ADN específico en la muestra original. La técnica se base en la detección y medición de la fluorescencia generada durante la amplificación del ADN.
Este método usa sondas fluorescentes que se unen específicamente al segmento de ADN de interés, durante la extensión de la cadena de ADN por la polimerasa, la sonda se degrada, existen dos tipos de qPCR:

- con sondas de hidrólisis que se degrada la sonda por acción de la polimerasa de ADN, liberando fluoróforos y la qPCR con sondas de unión por FRET.

6) ¿Qué criterios hay que tener en cuenta para el diseño de primers?

- Se necesita una longitud de 18 a 25 nucleótidos para asegurar una unión específica al sitio diana.
- Temperatura
- Contenido de bases GC debe ser equilibrado (40 a 60%.)

Scanned with CamScanner